



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE ÁCIDO
GÁLICO/DERIVADOS E MONÔMEROS FUNCIONAIS.**

WELMAN CURI ELIAS

Florianópolis
junho/2010

Welman Curi Elias

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE ÁCIDO
GÁLICO/DERIVADOS E MONÔMEROS FUNCIONAIS.**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Florianópolis
06/2010

Welman Curi Elias

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE ÁCIDO
GÁLICO/DERIVADOS E MONÔMEROS FUNCIONAIS.**

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos
Orientador

Prof. Dr. Marcus César Mandolesi Sá

Prof. Dr. Santiago Francisco Yunes

Florianópolis
junho/2010

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Josiel Barbosa Domingos, por toda dedicação, paciência, conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo.

Ao Professor José Carlos Gesser, pelos ensinamentos e apoio ao longo desse trabalho.

Ao Renato e o Ismael, do Polissol, pelos ensinamentos e apoio na operação do Fluorímetro.

Aos Professores que contribuíram para a minha formação.

À minha família, pela confiança e apoio que foram dedicados ao longo de minha vida.

A minha namorada Márcia.

Aos amigos do LACBIO.

Aos amigos e todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A UFSC, pela infra-estrutura

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Polímeros por Impressão Molecular	11
2.2 Ácido Gálico/Derivados.....	13
2.3 Associação Molecular	14
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Materiais	21
4.2 Equipamentos	21
4.3 Métodos	21
4.3.1 <i>Determinação das Razões Estequiométricas pelo Método da Razão Molar por Espectrofotometria no UV–Vis</i>	<i>21</i>
4.3.2 <i>Determinação das Razões Estequiométricas pelo Método de Job por Fluorimetria</i>	<i>23</i>
4.2.3 <i>Determinação das Constantes de Associação (K_a) por Fluorimetria</i>	<i>25</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Ácido Gálico)	28
5.1.1 <i>Determinação da razão estequiométrica e constante de associação</i>	<i>28</i>
5.2 Ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico	33
5.2.1 <i>Determinação da razão estequiométrica e constante de associação</i>	<i>33</i>
5.3 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila	36
5.3.1 <i>Determinação da razão estequiométrica e constante de associação</i>	<i>36</i>
5.4 3,4,5-triacetoxibenzoato de octila	39
5.4.1 <i>Determinação da razão estequiométrica</i>	<i>39</i>
5.5 3,4,5-triacetoxi- <i>N</i> -fenilbenzamida	40
5.5.1 <i>Determinação da razão estequiométrica e constante de associação</i>	<i>40</i>
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8. ANEXOS	46

8.1 Gráficos da determinação da estequiometria pelo método da razão molar por espectrofotometria do UV-Vis	46
8.2 Gráficos da determinação da estequiometria pelo método de Job por Fluorimetria.....	51
8.3 Gráficos da determinação da constante de associação pelo método de Benesi-Hildebrand por Fluorimetria	58
8.4 Gráficos da determinação da constante de associação, com 2 e 10% de Benzeno em ACN, pelo método de Benesi-Hildebrand, por Fluorimetria	62
8.5 Gráficos da determinação da constante de associação entre EAG e AAGac com BZ, pelo método de Benesi-Hildebrand, por Fluorimetria	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas na síntese de um Polímero Impresso Molecularmente.....	12
Figura 2. Ácido gálico e seus derivados amida e éster.....	13
Figura 3. Gráfico gerado pelo método de Job.....	14
Figura 4. Gráfico gerado pelo método da razão molar.....	15
Figura 7. Estruturas do substrato AG e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY..	28
Figura 8. Gráfico da razão molar, obtido pela formação do complexo entre AG e AA por espectrofotometria no UV–Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.	29
Figura 9. Gráfico Job obtido pela associação entre AG e AA por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.	29
Figura 10. (a) Gráfico da determinação da K_a pelo método de Benesi-Hildebrand obtido pela associação entre AG e AA por UV-Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente; (b) Gráfico do método de Job, obtido pela associação entre AG e AA por UV-Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.	30
Figura 11. Gráfico Benesi–Hildebrand obtido pela associação entre AG e AA acompanhada por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.....	31
Figura 12. Gráfico Benesi–Hildebrand obtido pela associação entre AG e MCA acompanhada por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.....	32
Figura 13. Supressão da emissão do AG após adição do monômero funcional AAPY.....	33
Figura 14. Estruturas do substrato AGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VP.	34
Figura 15. Híbridos de ressonância do Ácido Gálico.	35
Figura 16. Estruturas do substrato EAG e os monômeros AA, MCA, AAPY e VP.	37
Figura 17. Interação do EAG com a VPY.....	38
Figura 18. Estruturas do substrato EAGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY.....	39
Figura 19. Estruturas do substrato AAGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY.....	41
Figura 20. (a) Estruturas de ressonância da AAGac; (b) Interação da AAGac com MCA.....	42

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por UV-Vis.....	22
Tabela 2. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por Fluorimetria.....	24
Tabela 3. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por Espectrofotometria no Fluorimetria, todos a 25 ° C.	26
Tabela 4. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AG-AA, AG-MCA, AG-AAPY e AG-VPY.	28
Tabela 5. Valores de K_a para os sistemas AG-AA e AG-MCA.	31
Tabela 6. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AGac-AA, AGac-MCA, AGac-AAPY e AGac-VPY.....	34
Tabela 7. Valores de K_a para os sistemas AGac-AA e AGac-MCA	35
Tabela 8. Valores da razão estequiométrica para os sistemas EAG-AA, EAG-MCA, EAG-AAPY e EAG-VP.	36
Tabela 9. Valores de K_a para os sistemas EAG-AA, EAG-MCA e EAG-VPY.....	37
Tabela 10. Valores de K_a para os sistemas EAG-VPY 2% BZ, EAG-VPY 10% BZ, EAG-BZ.	38
Tabela 11. Valores da razão estequiométrica para os sistemas EAGac-AA, EAGac-MCA, EAGac-AAPY e EAGac-VPY.....	39
Tabela 12. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AAGac-AA, AAGac-MCA, AAGac-AAPY e AAGac-VPY.....	40
Tabela 13. Valores de K_a para os sistemas AAGac-AA, AAGac-MCA e AAGac-VPY.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

MIP	Polímero Impresso Molecularmente
AG	Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico
AGac	Ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico
AAGac	3,4,5-triacetoxi- <i>N</i> -fenilbenzamida
EAG	3,4,5-trihidroxibenzoato de octila
EAGac	3,4,5-triacetoxibenzoato de octila
K_a	Constante de Associação
b	Caminho Óptico
$\Delta\epsilon$	Variação no Coeficiente de Extinção Molar
S	Substrato
M	Monômero funcional
<i>S-M</i>	Complexo formado entre substrato e monômero funcional
ΔA	Variação de Absorbância
$[L_0]$	Concentração total do monômero funcional
$[S_0]$	Concentração inicial do substrato
UV–Vis	Ultravioleta-Visível
Φ_f	Rendimento quântico do fluoróforo
I_e	Intensidade de luz emitida
I_0	Intensidade de radiação
F	Intensidade de fluorescência em solvente puro
F_0	Intensidade de fluorescência do complexo <i>S-M</i>
F_1	Intensidade de fluorescência em uma dada concentração de ligante
AA	Ácido Acrílico
MCA	Metacrílamida
VPY	4–Vinilpiridina
AAPY	2,6-diacriloilaminopiridina
ACN	Acetonitrila

RESUMO

Nesse trabalho determinou-se, por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria, a estequiometria e constante de associação entre substratos derivados do ácido gálico e monômeros funcionais como parte de estudos de pré-polymerização, para construção de polímeros impressos molecularmente, a serem utilizados como agentes controladores a liberação de fármacos.

Os substratos estudados foram o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (AG), ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico (AGac), 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (EAG) e o 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida (AAGac) e os monômeros funcionais ácido acrílico (AA), 4-vinilpiridina (VP), metacrílamida (MCA).

As estequiometrias dos complexos (*S-M*) puderam ser determinadas por diferentes técnicas, espectrofotometria no UV-Vis e Fluorimetria, e diferentes métodos, razão molar e job. Os valores de razão estequiométrica apresentaram discrepância em alguns resultados, não devido ao método utilizado, mas sim à técnica.

As constantes de associação foram calculadas para os substratos pelo método de Benesi-Hildebrand. Os complexos moleculares entre AG-AA ($K_a = 2697$), EAG-VP ($K_a = 23514$), AAGac-VPY ($K_a = 1733$) e AAGac-MCA ($K_a = 2107$) foram os que apresentaram maior K_a dentre os sistemas estudados.

Palavras-chave: Ácido gálico, constante de associação, UV-VIS e Fluorescência.

1. Introdução

O ácido gálico e seus derivados têm sido amplamente utilizados na indústria farmacêutica¹ como antioxidantes, além de possuírem atividades inibidoras do vírus da herpes HSV-1 e HSV-2 e do vírus da AIDS HIV-1². Apesar destas importantes propriedades tornarem o ácido gálico e seus derivados bons candidatos para criação de sistemas de liberação controlada de fármacos, poucos estudos tem sido reportados na literatura com tal finalidade, e até o momento nenhum trabalho relacionado com a utilização de MIPs como matrizes de sistemas de liberação destes fármacos foi realizado.

Este trabalho tem por objetivo estudar a otimização na construção de MIP's (Pré-Polimerização) que possam liberar controladamente o ácido gálico/derivados a um sitio específico. A otimização pode ser feita através de estudos na formação dos complexos *S-M*, determinando-se suas constantes de associação, por técnicas como espectrofotometria na região do UV-Vis e Fluorimetria e assim escolher racionalmente quais monômeros funcionais utilizar na síntese dos MIP's.

2. Revisão da Literatura

2.1 Polímeros por Impressão Molecular

Polímeros formados por Impressão Molecular (MIP's) são materiais poliméricos preparados com o objetivo de formar, por toda a rede polimérica, cavidades complementares a uma molécula modelo (substrato). A preparação do MIP é feita em uma seqüência de passos³ (Figura 1).

Primeiro, o substrato se liga a monômeros funcionais (ligantes) em um solvente inerte. Essa ligação pode ser covalente ou não covalente (interações eletrostáticas, forças de *van der waals*, interações π - π *stacking* ou ligações de hidrogênio). Um co-monômero formador da rede polimérica (Cross-Linker) é adicionado ao meio. Uma substância iniciadora deve ser adicionada para que a polimerização comece. Por ação de calor ou luz ultravioleta a co-polimerização ocorre e o complexo resultante da interação *Substrato-Monômero Funcional (S-M)* é incorporado na rede polimérica. Após a polimerização, o substrato deve ser extraído

do polímero, deixando assim cavidades complementares na rede polimérica. A cavidade deve ser então, capaz de reconhecer seletivamente a molécula modelo ³.

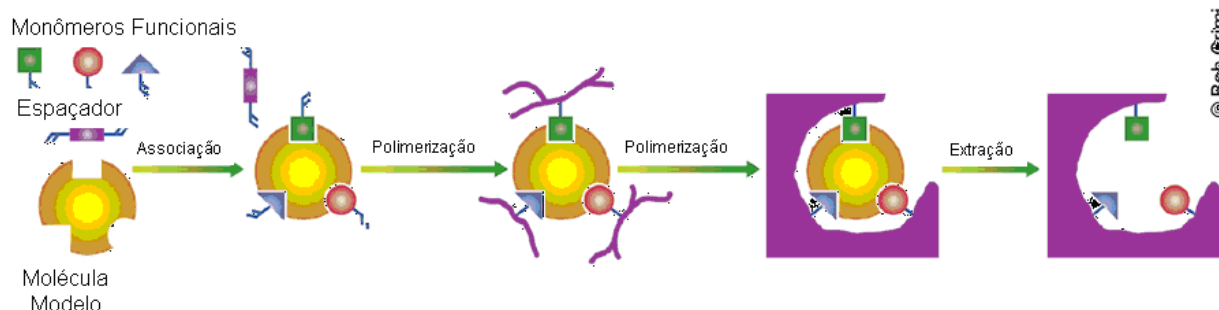


Figura 1. Etapas na síntese de um Polímero Impresso Molecularmente.

A religação seletiva da molécula modelo com o MIP pode ser explorada em sensores eletroquímicos⁴, liberação controlada de fármacos⁵ e separações analíticas⁶, entre outras aplicações.

A formação de cavidades complementares a um substrato em um MIP's possibilita o reconhecimento molecular, que constitui uma ferramenta bem desenvolvida na área analítica, principalmente no que se refere à separação e quantificação de diferentes substâncias, como fármacos e moléculas bioativas, presentes em matrizes mais ou menos complexas. Outra razão que tem promovido o interesse pelos MIPs reside no fato de estes poderem mimetizar receptores biológicos em estudos de desenvolvimento de novas substâncias com atividade farmacológica e também poderem detectar substâncias específicas em fluidos biológicos (como, por exemplo, nos testes de detecção de drogas de abuso)⁷.

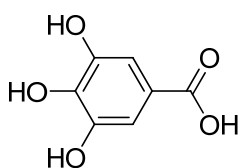
A escolha racional de monômeros funcionais através de estudos pré-polimerização é uma etapa importante na otimização de MIP's^{8, 9}, pois esses estudos permitem que a interação o substrato e monômeros funcionais seja avaliada através da determinação da constante de formação do complexo molecular Substrato - Monômero. A constante de associação (K_a) do complexo S-M pode ser determinada com o uso de diferentes técnicas, como RMN - ¹H, fluorimetria, e espectrofotometria no UV-Vis. Assim, a escolha de um monômero funcional mais adequado para um

determinado substrato na síntese do MIP pode ser feita de maneira racional através da obtenção do valor da K_a do complexo *S-M*.

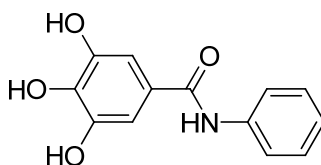
2.2 Ácido Gálico/Derivados

O ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Figura 2), também conhecido como ácido gálico, é um ácido orgânico encontrado amplamente em todo reino vegetal em sua forma livre ou como taninos. Em sua forma pura apresenta-se como um sólido incolor e cristalino. Tanto o ácido gálico como seus derivados são utilizados na indústria farmacêutica, isto porque estudos *in vitro* e *in vivo* em humanos, animais e cultura de células indicam que estes compostos agregam uma serie de propriedades extremamente relevantes em seus usos como fármacos, como: (1) mostram citotoxicidade a células cancerígenas sem dano a células saudáveis¹⁰, (2) utilizados no tratamento de diabetes¹¹, (3) apresentam propriedades antifúngicas e antivirais¹², (4) fornecem proteção a células contra processos oxidativos¹³, (5) podem ser usados no tratamento de psoríases e hemorroidas externas¹⁴.

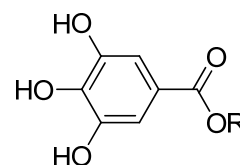
Apesar destas importantes propriedades tornarem o ácido gálico e seus derivados bons candidatos para criação de sistemas de liberação controlada de fármacos, poucos estudos tem sido reportados na literatura para tal finalidade, como por exemplo, a incorporação do derivado éster do ácido gálico (ácido tânico) em micropartículas de quitosana como sistemas de liberação controlada *in vitro*¹⁵, e até o momento nenhum trabalho relacionado com a utilização de MIPs como matrizes de sistemas de liberação destes fármacos.



Ácido Gálico



Amida (3)



R = C₈H₁₇

Éster (2)

Figura 2. Ácido gálico e seus derivados amida e éster.

2.3 Associação Molecular

Estudos de associação molecular estão inseridos dentro da área de química supramolecular e são importantes no desenvolvimento de MIP's, onde se estuda, através de ensaios de pré-polimerização, a associação na formação do complexo molecular *S-M*.

Complexos moleculares são espécies formadas pela associação não covalente de duas ou mais moléculas. Por convenção, o substrato (S) é a espécie na qual uma propriedade física ou química está sendo medida e o monômero funcional (M) é a espécie cuja concentração é a variável independente¹⁶.

A formação de complexos moleculares pode ocorrer em diferentes razões estequiométricas *S-M*, sendo que as proporções 1:1, 1:2 e 2:1 são reportadas na literatura como sendo mais estáveis e de mais fácil detecção em solução.

A determinação da razão estequiométrica mais estável pode ser feita através do método de Job (*Job Plot*)¹⁶, que consiste em fazer a aquisição de 10 sistemas *S-M*, variando-se de a fração molar das duas espécies de 0 a 1, mas mantendo a soma das concentrações das espécies constante (Figura 3).

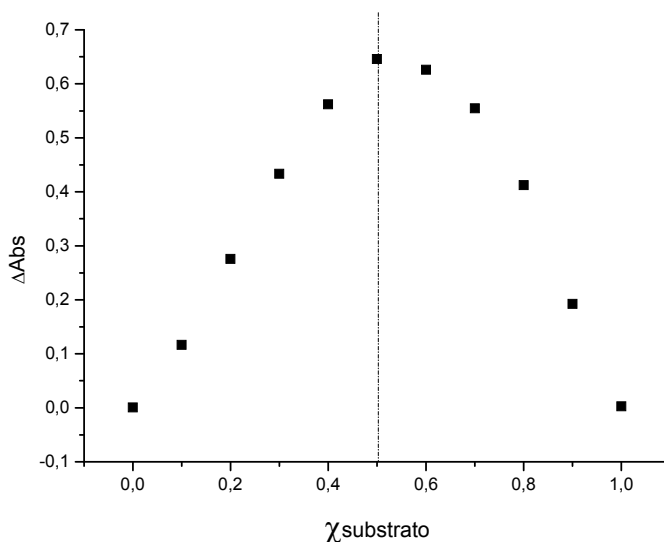


Figura 3. Gráfico gerado pelo método de Job.

No gráfico, $\chi_{\text{substrato}}$ é fração molar do substrato e ΔAbs é a variação da absorvância em um determinado comprimento de onda. O ponto máximo ($\chi_{\text{substrato}} = 0,5$) fornece informação a respeito da razão estequiométrica do complexo formado em solução.

Outro método de se obter a razão estequiométrica mais estável é através do método da razão molar¹⁷, que consiste em fazer a aquisição de sistemas *S-M* mantendo-se a concentração do substrato constante e variando-se o numero de equivalentes do monômero funcional (Figura 4).

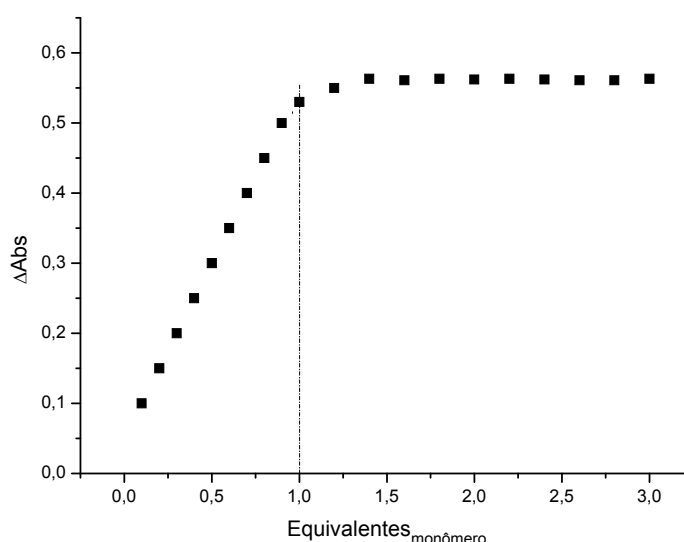


Figura 4. Gráfico gerado pelo método da razão molar.

No gráfico acima, $\text{Equivalente}_{\text{monômero}}$ é o número de equivalentes do monômero funcional e ΔAbs é a variação da absorvância em um determinado comprimento de onda. Pela intersecção das retas ($\text{Eq}_{\text{monômero}} = 1,0$) obtêm-se a informação a respeito da razão estequiométrica do complexo formado em solução.

Através dos dados obtidos experimentalmente pode-se determinar a constante de equilíbrio para a formação do complexo mais estável utilizando funções matemáticas. Alguns dos métodos mais conhecidos e utilizados são da década de 1950 e 1960 sendo eles: Benesi-Hildebrand, Scatchard, Scott e Rose-Drage¹⁸.

Esses métodos descrevem complexos do tipo *S-M(1:1)*, sendo a detecção separada dos diferentes complexos formados, quando o complexo é do tipo *S-M(1:N)*, onde $N > 1$, concomitantemente em solução pode não se tornar possível

por espectrofotometria no UV–Vis e fluorimetria. Assim, a constante de equilíbrio medida não será determinada quando o complexo *S-M* apresentar razão estequiométrica diferente de 1:1.

A constante de equilíbrio para a formação de complexos em solução pode ser determinada, por espectrofotometria no UV–Visível, segundo a equação de Benesi-Hildebrand ¹⁶ (equação 1).

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{[S_0] K_a \Delta \varepsilon [L_0]} + \frac{1}{[S_0] \Delta \varepsilon} \quad \text{Equação 1}$$

Na equação, o termo ΔA é a absorvância medida em cada concentração de L_0 diminuída da absorvância inicial do substrato em um determinado comprimento de onda. Os termos $[S_0]$ e $[L_0]$ são, respectivamente, as concentrações iniciais do substrato e total do monômero funcional (ligante). O gráfico de $1 / \Delta A$ em função de $1 / [L_0]$ (Figura 5) fornece, através dos coeficientes linear e angular, a constante de formação K_a do complexo *S-M*.

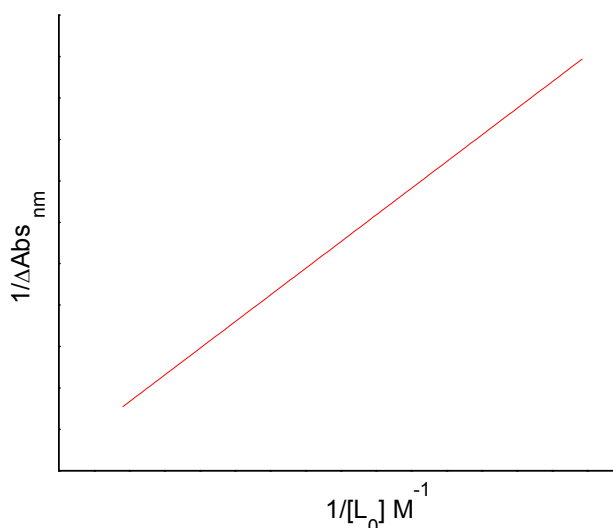


Figura 5. Gráfico de Benesi-Hildebrand para espectrofotometria no UV-Vis.

Pela técnica de espectrofotometria de UV-Vis, acompanha-se a absorvância do complexo molecular em um determinado comprimento de onda. Essa propriedade

é diretamente relacionada com a concentração do complexo através da Lei de Lambert–Beer:

$$\text{Abs}_{\text{complexo}} = \varepsilon \cdot [\text{Complexo}] \quad (\text{considerando caminho óptico} = 1 \text{ cm})$$

O ε (coeficiente de absortividade molar) é uma medida da intensidade com que a absorção ocorre no comprimento de onda estudado. Quanto maior ε , maior a intensidade da absorção. Cada espécie química possui um valor característico de ε , assim, o valor de ε do substrato é diferente do valor do ε de cada complexo formado em solução.

O ε dos complexos *S-M* é diferente do ε do *S* devido às interações entre os orbitais do substrato envolvidos na transição eletrônica em questão com os orbitais do monômero funcional. Essa mudança na diferença de energia entre os orbitais do substrato envolvidos na transição eletrônica é que permite a determinação da razão estequiométrica, já que a mudança nos valores de ε de cada complexo formado e de sua concentração na solução é contabilizada nos valores de absorbância no comprimento de onda da transição eletrônica acompanhada, e é proporcional a magnitude das forças de interação envolvidas entre as espécies formadoras de cada complexo formado em solução.

A referida constante de associação também pode ser determinada por fluorimetria¹⁹. Neste caso, acompanha-se a variação da intensidade de fluorescência do substrato enquanto a concentração do ligante é variada. A concentração do substrato permanece constante ao longo do experimento. A equação 2 é a equação de Benesi–Hildebrand para determinações da K_a dos complexos moleculares em solução.

$$\frac{1}{F_0 - F} = \frac{1}{K_a [L_0] (F_0 - F_1)} + \frac{1}{F_0 - F_1} \quad \text{Equação 2}$$

Nesta equação, o termo F_0 e F_1 são a intensidade de fluorescência em solvente quando $[L_0] = 0$ e na presença de $[L_0]$ respectivamente. F é a intensidade de fluorescência quando a concentração do monômero funcional é muito alta, onde existe praticamente apenas o complexo coordenado *S-M*. O gráfico de $1/(F_0 - F)$ em

função de $1 / [L_0]$ (Figura 6) fornece, através dos coeficientes linear e angular, a constante de formação K_a do complexo $S-M$.

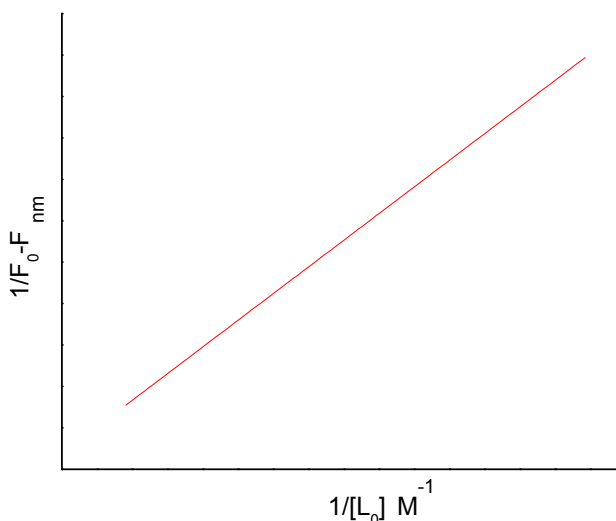


Figura 6. Gráfico de Benesi-Hildebrand para Fluorimetria.

Por Fluorimetria, acompanha-se a banda de emissão do complexo molecular, que também é diretamente relacionada com a concentração do complexo como mostrada na equação 3.

$$I_e = 2,3I_0\varepsilon\Phi_f b[\text{complexo}] \quad \text{Equação 3}$$

Onde I_e é a intensidade de luz emitida, I_0 é a intensidade de radiação, Φ_f é o rendimento quântico do fluoróforo, b é o caminho óptico e ε é o coeficiente de extinção molar do complexo.

O Φ_f (rendimento quântico) é uma medida do numero de fótons emitidos dividido pelo numero de fótons absorvidos. Então quanto maior o Φ_f , maior será a intensidade de emissão do complexo molecular. Cada espécie química possui um valor característico de Φ_f , assim, o valor de Φ_f do substrato é diferente do valor do Φ_f de cada complexo formado em solução.

Como o Φ_f e ε dos referidos complexos é diferente do Φ_f e ε do substrato devido às interações entre os orbitais do substrato envolvidos na transição eletrônica

em questão com os orbitais do monômero funcional. Essa mudança na diferença de energia entre os orbitais do substrato envolvidos na transição eletrônica acompanhada, é que permite a determinação da estequiometria e K_a do sistema através da Fluorimetria, já que a mudança nos valores de ε e Φ_f de cada complexo formado e de sua concentração na solução é contabilizada nos valores de absorbância no comprimento de onda da transição eletrônica acompanhada, e é proporcional a magnitude das forças de interação envolvidas entre as espécies formadoras de cada complexo formado em solução.

A aproximação de que a concentração inicial do ligante é igual a sua concentração no equilíbrio se torna válida desde que, experimentalmente, a concentração do ligante esteja em excesso com relação à concentração do substrato. Essa condição deve ser respeitada para que o método Benesi–Hildebrand seja aplicado, na espectrofotometria no UV–Vis, fluorimetria e por RMN ^1H ¹⁸. Além disso, a concentração do substrato deve permanecer constante durante todo o experimento.

De posse dos valores da constante de formação entre diferentes substratos e monômeros funcionais (ligantes), informações importantes podem ser obtidas acerca de que forças intermoleculares estão presentes nesses sistemas e de qual a magnitude dessas forças. Assim, a construção de polímeros molecularmente impressos pode ser feita de maneira racional.

3. Objetivos

1. Determinar, por espectrometria no UV-Vis, a estequiometria dos complexos formados entre os substratos (ácido gálico e derivados amida e éster) e diferentes monômeros funcionais (ácido acrílico, 4-vinilpiridina, metacrilamida e 2,6-diacrililaminopiridina), utilizando o método de *Job* e/ou da razão molar.
2. Determinar, por espectrometria no UV-Vis, as constantes de associação, pelo método de Benesi-Hildebrand, para os complexos formados entre os substratos e monômeros funcionais.
3. Determinar, por fluorimetria, a estequiometria dos complexos formados entre os substratos (ácido gálico e derivados amida e éster) e diferentes monômeros funcionais (ácido acrílico, 4-vinilpiridina, metacrilamida e 2,6-diacrililaminopiridina), utilizando o método de *Job* e/ou da razão molar.
4. Determinar, por fluorimetria, as constantes de associação, pelo método de Benesi-Hildebrand, para os complexos formados entre os substratos e monômeros funcionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes e solventes usados foram: ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (AG) *Aldrich* 99%, ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico (AGac) sintetizado pelo aluno de doutorado Juliano Vicente, o 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (EAG) *Aldrich* 99%, o 3,4,5-triacetoxibenzoato de octila (EAGac) sintetizado pelo aluno de doutorado Juliano Vicente, 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida (AAGac) sintetizado pelo aluno de doutorado Juliano Vicente, ácido acrílico (AA) *Fluka* 99 %, metacrílamida (MCA) *Fluka* 99 %, 2,6-diacriloilaminopiridina (AAPY) sintetizado pelo aluno de doutorado Juliano Vicente, Ácido Acrílico (AA) *Fluka* 99 %, 4-Vinilpiridina (VPY) *Aldrich* 95%, Acetonitrila Espectroscópica *Carlo Erba* e Benzeno Espectroscópico *Aldrich*.

4.2 Equipamentos

Fluorímetro Hitachi F4500 e espectrofotômetro UV-Vis Varian Carry 50 Bio.

4.3 Métodos

4.3.1 Determinação das Razões Estequiométricas pelo Método da Razão Molar por Espectrofotometria no UV-Vis

As razões estequiométricas entre os substratos ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico), ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico, o 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila e o 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida e os monômeros funcionais ácido acrílico, 4-vinilpiridina, metacrílamida e 2,6-diacriloilaminopiridina foram determinadas, por espectrofotometria no UV-Vis, como já discutido, por um método bem estabelecido na literatura, o método da razão molar.

Nesse método, a aquisição espectral de várias soluções é obtida. Em todas as soluções a concentração do substrato é mantida constante, enquanto a concentração do monômero (ligante) é variada de 0 a 6 equivalentes. Acompanha-se a variação da absorvância de uma banda do substrato, e um gráfico de absorvância por número de equivalentes do monômero funcional é feito para determinação da razão estequiométrica, que é obtida a partir da quebra da linearidade da curva obtida.

Em todos os experimentos, duas soluções estoque foram preparadas:

A) Substrato em concentração conhecida.

B) Monômero Funcional em concentração conhecida + substrato presente na mesma concentração da solução A.

O solvente usado foi Acetonitrila espectroscópica (ACN).

Os experimentos foram feitos seguindo o seguinte procedimento: em uma cubeta de quartzo contendo 1,0 ml da solução A realizou-se aquisição espectral de 200 a 900 nm. Foi, então, adicionada uma alíquota da solução B à mesma cubeta onde foi tomada a aquisição espectral da solução A. Após 1 minuto, uma nova aquisição espectral foi feita. Sucessivas alíquotas de solução B foram adicionadas à mesma cubeta, sempre respeitando o intervalo de 1 minuto entre a adição de cada alíquota de solução B e cada aquisição espectral realizada.

Os valores de absorbância do substrato no comprimento de onda acompanhado foram tomados e plotados em um gráfico de razão molar. Neste gráfico, pode-se notar duas regiões. A transição de uma região para outra se dá no ponto onde todo o substrato está complexado e não há nem substrato nem ligante livre em solução. Este ponto de inflexão marca a razão estequiométrica do complexo.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros experimentais referentes a cada experimento realizado por espectrofotometria no UV-Vis.

Tabela 1. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por UV-Vis.

Sistema Estudado	Banda Acompanhada (nm)	[Substrato] (mM)
AG-AA	270	2,000
AG-MCA	274	2,000
AG-VPY	230	2,000
AGac-AA	245	2,100
AGac-MCA	255	2,100
AGac-VPY	235	2,100
EAG-AA	268	0,710
EAG-MCA	267	0,710
EAG-VPY	228	0,710

AAGac-AA	256	0,503
AAGac-MCA	250	0,503
AAGac-VPY	242	0,503

Os monômeros AA, MCA e VPY, absorvem na região estudada (216-275 nm), então, em relação à medida de estequiometria por UV-Vis nos complexos *S-M* deve-se destacar que a absorbância medida foi descontada da absorbância desses monômeros na região estudada para que se chega-se ao valor de ΔA no gráfico da razão molar. Essas absorbâncias individuais do AA, MCA e VPY foi realizada em um experimento adicional utilizando apenas solvente e monômero nas mesmas concentrações usadas na Tabela 1.

4.3.2 Determinação das Razões Estequiométricas pelo Método de Job por Fluorimetria

As razões estequiométricas entre os substratos ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico), ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico, o 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila, o 3,4,5-triacetoxibenzoato de octila e o 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida e os monômeros funcionais ácido acrílico, 4-vinilpiridina , metacrílamida e 2,6-diacriloilaminopiridina foram determinadas, por fluorimetria, como já discutido, por um método bem estabelecido na literatura, o método de Job.

Nesse método, a aquisição espectral de 11 soluções é obtida. Em todas as soluções variou-se a fração molar das duas espécies de 0 a 1 mantendo a soma das concentrações das espécies constante. Acompanha-se a variação da intensidade de fluorescência de uma banda do substrato, e um gráfico de Job é feito para determinação da razão estequiométrica, que é obtida a partir do ponto de maior variação da intensidade de fluorescência.

Em todos os experimentos, duas soluções estoque foram preparadas:

- A) Substrato em concentração conhecida.
- B) Monômero Funcional na mesma concentração de A.

O solvente usado foi Acetonitrila espectroscópica (ACN).

Os experimentos foram feitos seguindo o seguinte procedimento: em 11 cubetas de quartzo preparou-se soluções de fração molar variando de 0 a 1, provenientes da mistura da solução A com solução B, respeitando a condição de que a soma total da concentração de substrato e monômero funcional é constante em todas as 11 cubetas.

A partir da aquisição espectral, os valores de intensidade de fluorescência do substrato no comprimento de onda acompanhado foram tomados e plotados em função da fração molar, em um gráfico de Job e obtida a razão estequiométrica do complexo S-M. A Tabela 2 apresenta os parâmetros experimentais referentes a cada experimento realizado por fluorimetria.

Tabela 2. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por Fluorimetria.

Sistema Estudado	[] (mM)	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Fenda de excitação (nm)	Fenda de emissão (nm)
AG-AA	0,05	270	340	2,5	5,0
AG-MCA	0,05	270	340	2,5	5,0
AG-VPY	0,05	270	340	2,5	5,0
AG-AAPY	0.05	270	340	2,5	5,0
AGac-AA	0,05	300	543	5,0	10
AGac-MCA	0,05	300	543	5,0	10
AGac-VPY	0,05	300	543	5,0	10
AGac-AAPY	0.05	300	340	5,0	10
EAG-AA	0,05	270	340	2,5	5,0
EAG-MCA	0,05	270	340	2,5	5,0
EAG-VPY	0,05	270	340	2,5	5,0
EAG-AAPY	0.05	300	340	2,5	5,0
EAGac-AA	0,05	270	340	5,0	5,0
EAGac-MCA	0,05	270	340	5,0	5,0

EAGac-VPY	0,05	270	340	5,0	5,0
EAGac-AAPY	0.05	300	340	5,0	5,0
AAGac-AA	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-MCA	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-VPY	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-AAPY	0.05	300	340	5,0	10

Os monômeros AA, MCA, VPY e AAPY, emitem na região estudada, então em relação à medida da razão estequiometria nos complexos *S-M* deve-se destacar que a intensidade de emissão medida foi descontada da intensidade de emissão desses monômeros na região estudada para que se chega-se ao valor de F_0-F no gráfico de Job. Essas absorbâncias individuais do AA, MCA, VPY e AAPY foi realizada em um experimento adicional utilizando apenas solvente e monômero nas mesmas concentrações usadas na Tabela 2.

4.2.3 Determinação das Constantes de Associação (K_a) por Fluorimetria

As constantes de associação aparente entre os substratos ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (ácido gálico), 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila os monômeros funcionais ácido acrílico e metacrílamida foram determinadas, por fluorimetria, como já discutido, por um método bem estabelecido na literatura, o método de Benesi-Hildebrand.

Nesse método, a aquisição espectral de várias soluções é obtida. Em todas as soluções a concentração do substrato é mantida constante, enquanto a concentração do monômero (ligante) é variada. Acompanha-se a variação da intensidade de fluorescência de uma banda do substrato, e um gráfico de Benesi-Hildebrand é feito para determinação da constante de associação, que é obtida a partir dos coeficientes angular e linear da reta. Os experimentos devem ser feitos a temperatura constante, já que os valores de constantes de equilíbrio apresentam dependência com a temperatura.

Em todos os experimentos, duas soluções estoque foram preparadas:

A) Substrato em concentração conhecida.

B) Monômero Funcional em concentração conhecida + substrato presente na mesma concentração da solução A.

O solvente usado foi Acetonitrila espectroscópica (ACN) e/ou Benzeno espectroscópico (BZ).

Os experimentos foram feitos seguindo o seguinte procedimento: em uma cubeta de quartzo contendo 1,0 ml da solução A realizou-se aquisição espectral de, emissão, 290 a 900 nm. Foi, então, adicionada uma alíquota da solução B à mesma cubeta onde foi tomada a aquisição espectral da solução A. Após 1 minuto, uma nova aquisição espectral foi feita. Sucessivas alíquotas de solução B foram adicionadas à mesma cubeta, sempre respeitando o intervalo de 1 minuto entre a adição de cada alíquota de solução B e cada aquisição espectral realizada.

Os valores de intensidade de fluorescência do substrato no comprimento de onda acompanhado foram tomados e plotados em um gráfico de Benesi-Hildebrand.

A K_a pôde então ser obtida através dos valores dos coeficientes angular e linear da reta $1/(F_0-F)$ em função de $1/[L_0]$ (inverso da concentração do ligante) plotada para cada sistema.

A tabela 3 apresenta os parâmetros experimentais referentes a cada experimento realizado por fluorimetria:

Tabela 3. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por Espectrofotometria no Fluorimetria, todos a 25 ° C.

Sistema Estudado	Solvente	[] (mM)	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Fenda de excitação (nm)	Fenda de emissão (nm)
AG-AA	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0
AG-MCA	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0
AG-VPY	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0
AGac-AA	ACN	0,05	300	543	5,0	10
AGac-MCA	ACN	0,05	300	543	5,0	10
AGac-VPY	ACN	0,05	300	543	5,0	10
EAG-AA	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0

EAG-MCA	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0
EAG-VPY	ACN	0,05	270	340	2,5	5,0
EAG-VPY	ACN + BZ 2% (v/v)	0,05	270	340	5,0	5,0
EAG-VPY	ACN + BZ 10% (v/v)	0,05	270	340	5,0	5,0
EAG-BZ	ACN	0,05	270	340	5,0	5,0
AAGac-AA	ACN	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-MCA	ACN	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-VPY	ACN	0,05	300	540	5,0	10
AAGac-VPY	ACN + BZ 2% (v/v)	0,05	270	340	5,0	5,0
AAGac-VPY	ACN + BZ 10% (v/v)	0,05	270	340	5,0	5,0
AAGac-BZ	ACN	0,05	270	340	5,0	5,0

5. Resultados e Discussão

5.1 Ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Ácido Gálico)

5.1.1 Determinação da razão estequiométrica e constante de associação

O ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (AG) é um dos substratos no qual se deseja preparar polímeros molecularmente impressos, para posteriores estudos de liberação controlada. Assim foram realizados estudos de determinação da razão estequiométrica e K_a entre AG e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY (figura 7). A razão estequiométrica e a K_a para tais sistemas foi obtida, quando possível, por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

As razões estequiométricas dos complexos formados entre AG e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY são mostrados na tabela 4 e foram obtidos por dois métodos, razão molar, obtida por UV-Vis, e Job, realizado por fluorimetria, como mostrado nas figuras 8 e 9.

Tabela 4. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AG-AA, AG-MCA, AG-AAPY e AG-VPY.

Razão Estequiométrica	AG-AA (S:M)	AG-MCA (S:M)	AG-AAPY (S:M)	AG-VPY (S:M)
UV-Vis (método da razão molar)	4:3	4:3	-	2:1
Fluorimetria (método de Job)	1:1	1:1	1:1	2:1

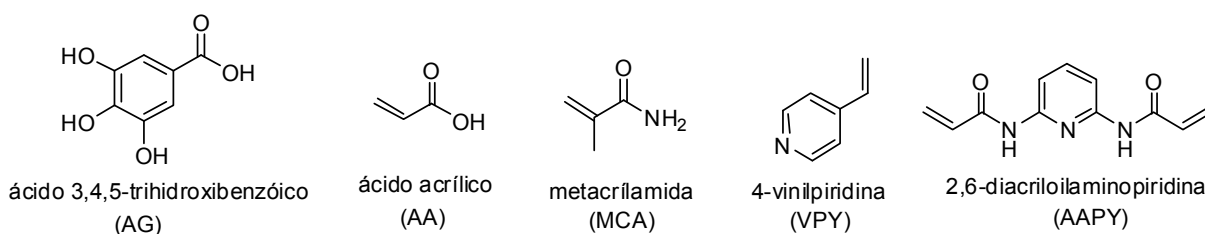


Figura 7. Estruturas do substrato AG e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY.

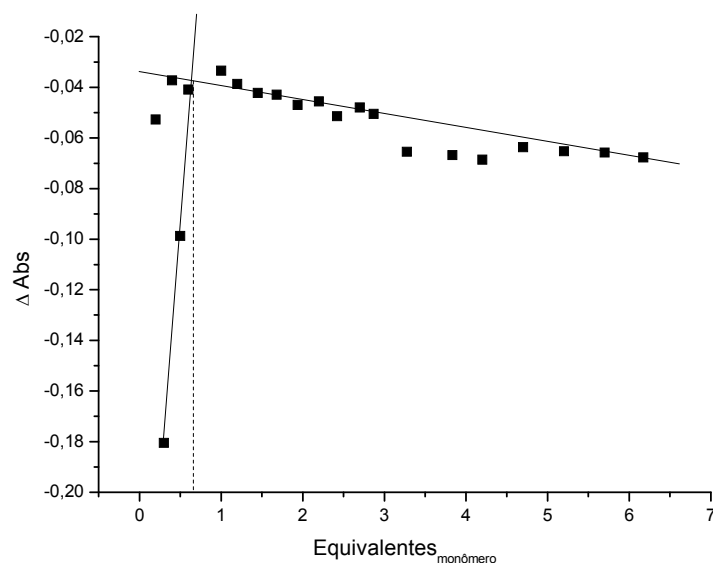


Figura 8. Gráfico da razão molar, obtido pela formação do complexo entre AG e AA por espectrofotometria no UV-Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.

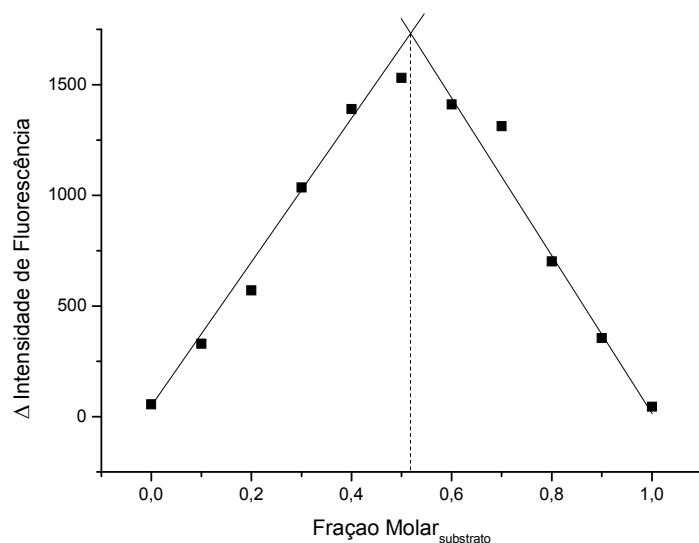


Figura 9. Gráfico Job obtido pela associação entre AG e AA por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.

Comparando-se os resultados mostrados nas figuras 8 e 9, pode-se perceber certa discrepância entre os métodos. Para o experimento mostrado na Figura 8, a razão molar é de 1:0,75 (ou 4:3), enquanto que para o experimento da Figura 9, a razão é 1:1. Atribui-se essa discrepância não ao método, mas sim a técnica utilizada na determinação das concentrações dos complexos S-M. Quando a

espectrofotometria no UV-Vis é utilizada, a ΔAbs é muito pequena em todos os complexos estudados, sendo na ordem de 10^{-1} - 10^{-3} . Como a variação de absorbância é muito pequena, o erro associado ao experimento se torna maior, gerando essa diferença de razão estequiométrica. Foram realizados, por espectrofotometria no UV-Vis os experimentos de determinação da razão estequiométrica pelo método de Job e a determinação da constante de associação pelo método de Benesi-Hildebrand, não sendo possível a obtenção desses resultados por essa técnica, como mostrado na Figura 10.

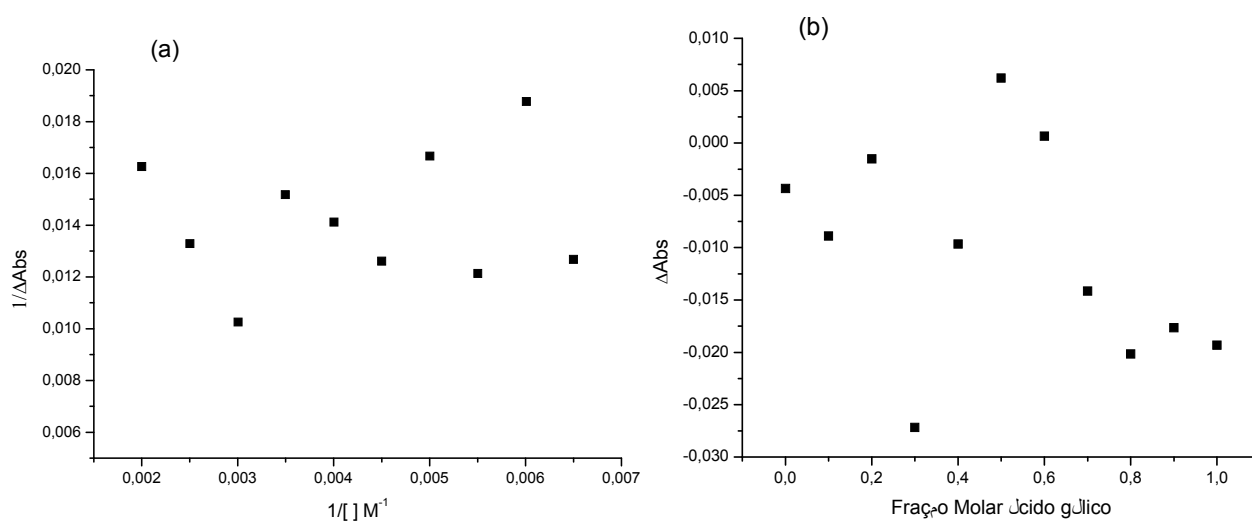


Figura 10. (a) Gráfico da determinação da K_a pelo método de Benesi-Hildebrand obtido pela associação entre AG e AA por UV-Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente; (b) Gráfico do método de Job, obtido pela associação entre AG e AA por UV-Vis, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.

Pelo gráfico fica evidente que o método de job para determinação da razão estequiométrica, e o método de Benesi-Hildebrand, ambos por UV-Vis não se mostraram técnicas eficientes

Assim a técnica de Fluorimetria foi utilizada como técnica principal, sempre que possível, para determinação da razão estequiométrica e constante de associação, já que mostra-se uma técnica mais sensível, comparada a UV-vis, apresentando resultados mais precisos.

As K_a dos complexos formados entre AG e os monômeros funcionais AA e MCA são mostrados na Tabela 5 e foram obtidos pelo método de Benesi-Hildebrand, realizado por fluorimetria, como mostrado nas figuras 11 e 12

Tabela 5. Valores de K_a para os sistemas AG-AA e AG-MCA.

K_a (M^{-1})	AG-AA	AG-MCA
Fluorimetria	2697	40

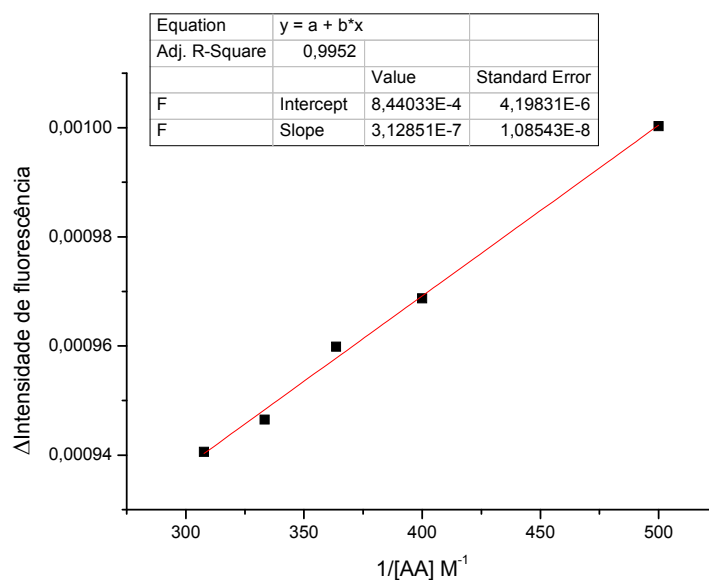


Figura 11. Gráfico Benesi-Hildebrand obtido pela associação entre AG e AA acompanhada por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.

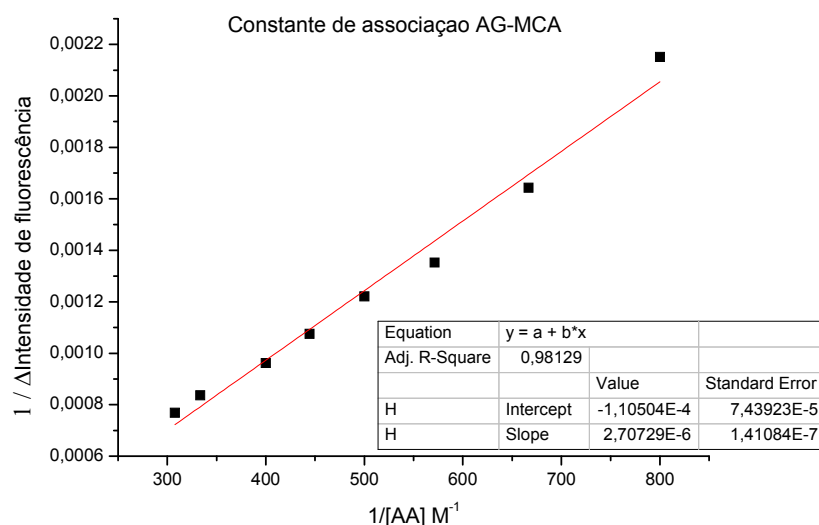


Figura 12. Gráfico Benesi–Hildebrand obtido pela associação entre AG e MCA acompanhada por Fluorimetria, a 25 °C utilizando acetonitrila como solvente.

Os valores mostrados na Tabela 5 são bastante interessantes, principalmente por mostrar uma preferência na associação do AG com AA muito maior do que com a MCA.

Apesar da complexidade de analisar-se os tipos e a quantidade de possíveis interações intermoleculares presentes na associação entre essas espécies em solução, destacaremos a seguir algumas delas que podem, a princípio, levar a uma racionalização dos resultados acima expostos.

Os valores de K_a para os complexos AG-AA e AG-MCA são bastante diferentes, sendo o do complexo AG-AA ($K_a = 2697$) sessenta e cinco vezes maior que o do AG-MCA ($K_a = 40$). Uma possível explicação para essa diferença seria a formação de um dímero AG-AG, já que dímeros de ácidos carboxílicos são bastante estáveis. Com a formação do dímero de AG, a única opção de interação para a MCA seriam os grupos hidroxílicos, o que geraria uma interação de menor magnitude do que com o ácido carboxílico, e assim uma menor K_a . Esse efeito pode ser observado no EAG, onde apenas as hidroxilas estão livres para interação de hidrogênio com o AA e a MCA, gerando K_a bem pouco intensas e de magnitude próximas dessa observada para o complexo molecular entre AG-MCA.

Já para o complexo molecular entre AG-AA, deve haver uma competição na formação do dímero de ácido carboxílico, já que o hidrogênio ácido, tanto do AG quanto do AA possuem pKa próximos, sendo 4,28 o pKa do AG e 4,50 do AA²⁰. Assim a interação do AA seria preferencialmente pela parte carboxílica do AG, gerando uma constante de K_a mais alta do que com a MCA.

Já a para o AG-AAPY não foi possível obter a K_a , pois a interação entre eles se mostrou muito intensa a ponto de suprimir a banda de emissão do AG como mostrado na Figura 13 para o AG.

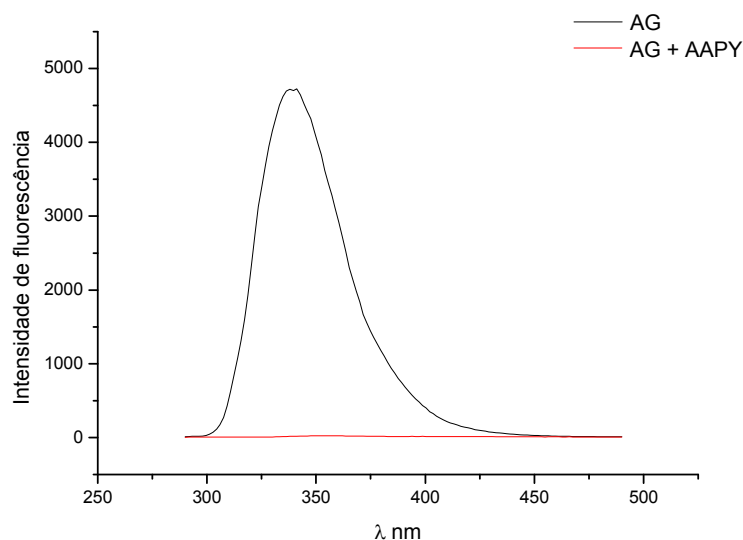


Figura 13. Supressão da emissão do AG após adição do monômero funcional AAPY.

Uma solução para este problema seria realizar o experimento por RMN-¹H, onde se acompanharia o deslocamento químico do hidrogênio das amidas, caso haja interação de hidrogênio, e/ou acompanhar os hidrogênios do anel piridínico, caso haja interação do tipo π - π -stacking.

5.2 Ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico

5.2.1 Determinação da razão estequiométrica e constante de associação

O ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico (AGac) é um substrato no qual se deseja verificar a influência dos grupos acetila na razão estequiométrica entre *S-M* e na

magnitude da constante de associação, em comparação ao seu derivado não acetilado. Assim, foram realizados estudos de determinação da razão estequiométrica entre AGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY. A razão estequiométrica para tais sistemas foi obtida, quando possível, por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

As razões estequiométricas dos complexos formados entre AGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY (Figura 14) são mostrados na Tabela 6 e foram obtidos por dois métodos, razão molar, realizado por UV-Vis, e Job, realizado por fluorimetria.

Tabela 6. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AGac-AA, AGac-MCA, AGac-AAPY e AGac-VPY.

Razão Estequiométrica	AGac-AA (S:M)	AGac-MCA (S:M)	AGac-AAPY (S:M)	AGac-VPY (S:M)
UV-Vis (método da razão molar)	3:4	1:1	-	2:1
Fluorimetria (método de Job)	1:1	1:1	1:1	-

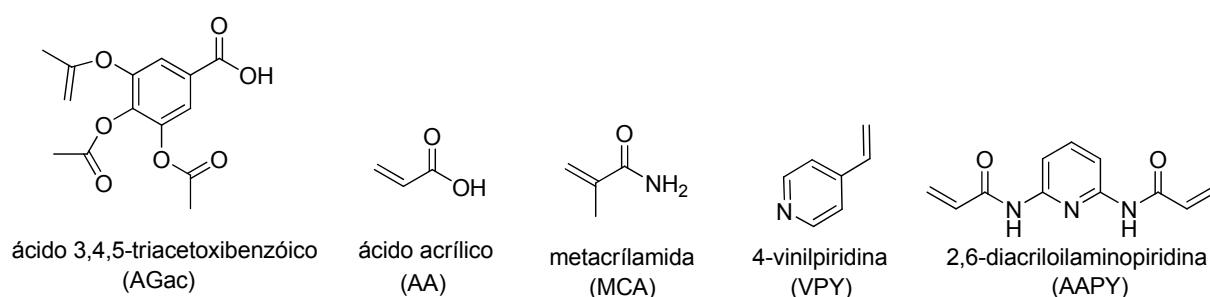


Figura 14. Estruturas do substrato AGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VP.

As K_a dos complexos formados entre AGac e os monômeros funcionais AA e MCA são mostrados na Tabela 7 e foram obtidos pelo método de Benesi-Hildebrand.

Tabela 7. Valores de K_a para os sistemas AGac-AA e AGac-MCA .

K_a (M^{-1})	AGac-AA	AGac-MCA
Fluorimetria	1143	1282

A interação do AGac com AA, MCA e AAPY, possui razão estequiométrica 1:1, ou seja, o complexo molecular com maior associação. Como se trata de sistemas 1:1, a equação de Benessi-Hildebrand foi utilizada para calcular a K_a desses complexos. Enquanto que para o complexo AGac-VPY, a razão estequiométrica é 2:1, não sendo possível a determinação das constantes de associação, pois a detecção separada dos diferentes complexos formados, quando o complexo é do tipo $S-M(2:1)$, concomitantemente em solução, não é possível por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

Os valores de K_a para os complexos AGac-AA e AGac-MCA são bem próximos, o que difere de seu derivado não acetilado. O complexo molecular entre AGac-AA gerou uma K_a duas vezes menor que de seu derivado não acetilado AG-AA, provavelmente devido ao efeito ativante dos grupo hidroxílico na posição *para* ao ácido carboxílico (Figura 15), enquanto que no AGac os grupos acetila desativam o anel, levando assim a uma interação menor com o monômero funcional.

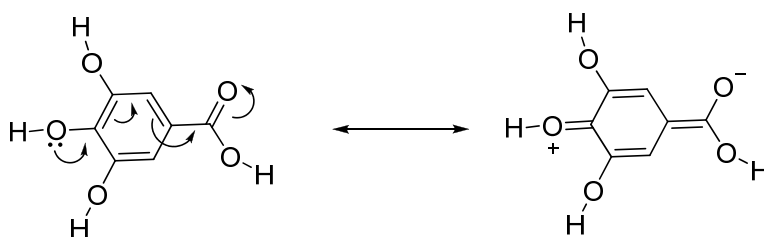


Figura 15. Híbridos de ressonância do Ácido Gálico.

Já para o complexo molecular entre AGac-MCA, a K_a é muito maior que de seu derivado AG. Levando em consideração que os grupos hidroxílicos foram acetilados no AGac, o único sitio de interação do substrato é a parte do ácido carboxílico e assim favorecendo a magnitude da K_a , quando comparada com o AG.

Para o AGac-AAPY não foi possível obter a K_a , pois a interação entre eles se mostrou muito intensa a ponto de suprimir a banda de emissão do AGac. Uma solução para esse problema seria realizar o experimento por RMN- ^1H .

5.3 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila

5.3.1 Determinação da razão estequiométrica e constante de associação

Nesta seção descreveremos os estudos realizados com o EAG, derivado Ester do ácido gálico, um substrato de interesse na preparação de MIP's. Assim foram realizados estudos de determinação da razão estequiométrica e K_a entre EAG e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY. A razão estequiometria e a K_a para tais sistemas foi obtida, quando possível, por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

As razões estequiométricas dos complexos formados entre EAG e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY (Figura 16) são mostrados na Tabela 8 e foram obtidos por dois métodos, razão molar, realizado por UV-Vis, e Job, realizado por fluorimetria.

Tabela 8. Valores da razão estequiométrica para os sistemas EAG-AA, EAG-MCA, EAG-AAPY e EAG-VP.

Razão Estequiométrica	EAG-AA (S:M)	EAG-MCA (S:M)	EAG-AAPY (S:M)	EAG-VPY (S:M)
UV-Vis (método da razão molar)	1:1	1:1	-	4:3
Fluorimetria (método de Job)	-	1:1	1:1	1:1

As K_a dos complexos formados entre EAG e os monômeros funcionais AA, MCA e VPY são mostrados na Tabela 9 e foram obtidos pelo método de Benesi-Hildebrand.

Tabela 9. Valores de K_a para os sistemas EAG-AA, EAG-MCA e EAG-VPY.

K_a (M^{-1})	EAG-AA	EAG-MCA	EAG-VPY
Fluorimetria	79	119	23514

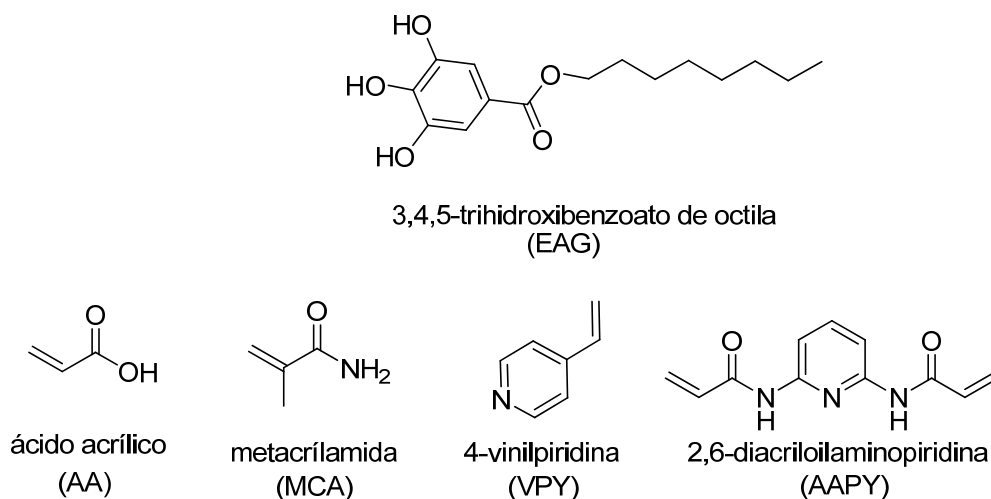


Figura 16. Estruturas do substrato EAG e os monômeros AA, MCA, AAPY e VP.

A interação do EAG com AA, MCA, VPY e AAPY, possui razão estequiométrica 1:1, ou seja, o complexo molecular com maior associação. Como se trata de sistemas 1:1, a equação de Benessi-Hildebrand, assim como para os sistemas mostrados anteriormente, foi utilizada para calcular a K_a . Para formação desses complexos.

As constantes de associação entre EAG-AA e EAG-MCA são baixas, comparadas a outros valores obtidos, já que a interação desses monômeros funcionais, provavelmente, deve ocorrer na parte fenólica do EAG, sendo os hidrogênios fenólicos bem menos ácidos do que os de ácidos carboxílicos como no AG e com isso as interações de hidrogênio se tornam pouco intensas.

Já o sistema EAG-VPY, possui uma alta K_a , graças a interações de hidrogênio e uma possível interação π - π -stacking, como mostrado na Figura 17, já que para

sistemas que realizam apenas interações de hidrogênio a K_a foi baixa, como observado no complexo EAG-AA e EAG-MCA.

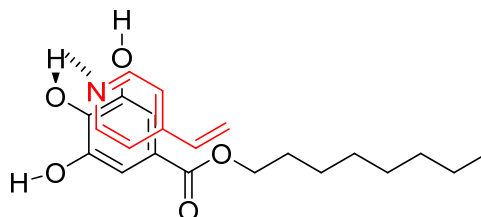


Figura 17. Interação do EAG com a VPY.

Para confirmar que a interação entre EAG-VPY é preferencialmente do tipo π - π -stacking, foi realizado experimentos entre EAG-VPY com adição de benzeno na proporção de 2%, 10% (v/v) e realizado um experimento de controle entre EAG e o benzeno (BZ), para se determinar as constantes de associação entre esses sistemas como mostrado na Tabela 10.

Tabela 10. Valores de K_a para os sistemas EAG-VPY 2% BZ, EAG-VPY 10% BZ, EAG-BZ.

K_a (M^{-1})	EAG-VPY 2% BZ v/v	EAG-VPY 10% BZ v/v	EAG-BZ
Fluorimetria	7765,95	5968,48	37175,32

Com adição de benzeno há uma diminuição da constante de associação entre EAG-VPY. Esse efeito ocorre provavelmente, pois o benzeno se empacota com as moléculas de substrato e monômero funcional, além de competir com o monômero funcional pelo sítio de interação do EAG. Isso fica evidenciado pelas altas K_a entre EAG-VPY e entre o EAG-BZ e a drástica diminuição quando há mistura deles.

Já para o EAG-AAPY não foi possível obter a K_a , pois a interação entre eles se mostrou muito intensa a ponto de suprimir a banda de emissão do EAG. Uma solução para esse problema seria realizar o experimento por RMN- 1H .

5.4 3,4,5-triacetoxibenzoato de octila

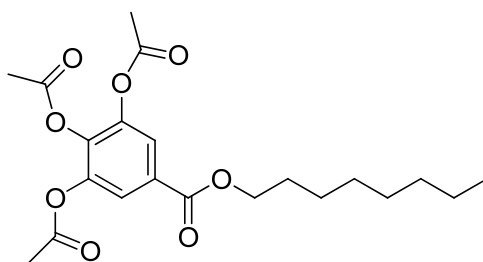
5.4.1 Determinação da razão estequiométrica

O 3,4,5-triacetoxibenzoato de octila (EAGac) é um substrato no qual se deseja verificar a influencia dos grupos acetila na razão estequiométrica entre *S-M* e na magnitude da constante de associação, em comparação ao seu derivado não acetilado. Assim foram realizados estudos de determinação da razão estequiométrica entre EAGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY.

As razões estequiométricas dos complexos formados entre EAGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAPY e VPY (Figura 18) são mostrados na Tabela 11 e foram obtidos pelo método de job, realizado por fluorimetria.

Tabela 11. Valores da razão estequiométrica para os sistemas EAGac-AA, EAGac-MCA, EAGac-AAPY e EAGac-VPY.

Razão Estequiométrica	EAGac-AA (S:M)	EAGac-MCA (S:M)	EAGac-AAPY (S:M)	EAGac-VPY (S:M)
Fluorimetria (método de Job)	2:1	2:1	1:3	4:1



3,4,5-triacetoxibenzoato de octila
(EAGac)

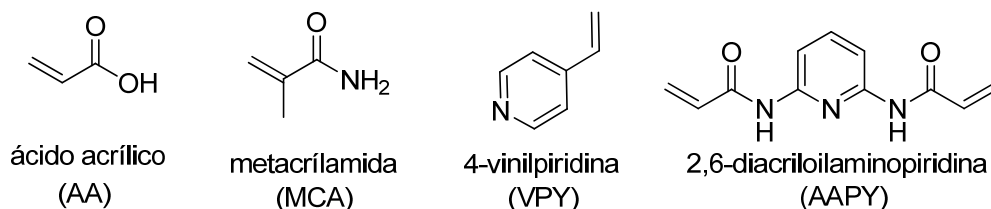


Figura 18. Estruturas do substrato EAGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY.

Os valores apresentados na Tabela 11 mostram que as razões estequiométricas são complexas para todos os monômeros funcionais estudados. Tais associações não podem ser estudadas pelo método de Benesi-Hildebrand, pois a detecção separada dos diferentes complexos formados concomitantemente em solução não é possível por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

Esses resultados de razão estequiométrica mostram que para o EAGac as interações com monômeros funcionais não devem ser específicas, já que não há um sítio de interação como um hidrogênio ácido ou um hidrogênio fenólico presentes nos substratos anteriores.

5.5 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida

5.5.1 Determinação da razão estequiométrica e constante de associação

O 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida (AAGac) é um dos substratos no qual se deseja preparar polímeros molecularmente impressos, para posteriores estudos de liberação controlada. Assim foram realizados estudos de determinação da razão estequiométrica entre AAGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAYP e VPY. A estequiometria para tais sistemas foi obtida, quando possível, por espectrofotometria no UV-Vis e fluorimetria.

As razões estequiométricas dos complexos formados entre AAGac e os monômeros funcionais AA, MCA, AAYP e VPY (Figura 19) são mostrados na tabela 12 e foram obtidos por dois métodos, razão molar, realizado por UV-Vis, e Job, realizado por fluorimetria.

Tabela 12. Valores da razão estequiométrica para os sistemas AAGac-AA, AAGac-MCA, AAGac-AAYP e AAGac-VPY.

Razão Estequiométrica	AAGac-AA (S:M)	AAGac-MCA (S:M)	AAGac-AAYP (S:M)	AAGac-VPY (S:M)
UV-Vis (método da razão molar)	-	4:3	-	4:3
Fluorimetria (método de Job)	1:1	-	-	-

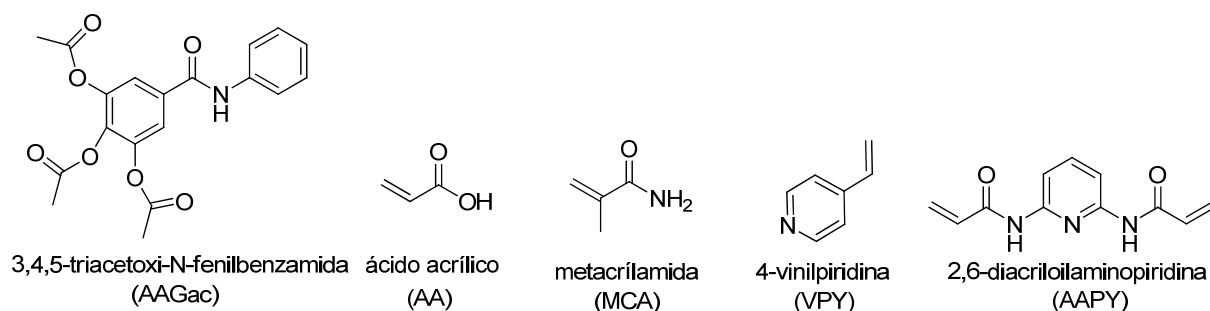


Figura 19. Estruturas do substrato AAGac e os monômeros AA, MCA, AAPY e VPY.

As K_a dos complexos formados entre AAGac e os monômeros funcionais AA, MCA e VPY são mostrados na Tabela 13 e foram obtidos pelo método de Benesi-Hildebrand.

Tabela 13. Valores de K_a para os sistemas AAGac-AA, AAGac-MCA e AAGac-VPY.

K_a (M^{-1})	AAGac-AA	AAGac-MCA	AAGac-VPY
Fluorimetria	217	2107	1733

A interação da AAGac com AA, possui razão estequiométrica 1:1, ou seja, o complexo molecular com maior associação. Já para os complexos moleculares entre AAGac-VPY e AAGac-MCA, a razão estequiométrica obtida foi de 4:3, pois sua obtenção só foi possível por espectrofotometria no UV-Vis. Essa razão estequiométrica foi considerada como 1:1, pois como observado para outros substratos, como EAG, a razão estequiométrica 4:3 obtida por espectrofotometria no UV-Vis apresentavam razão de 1:1 quando obtidas por fluorimetria para diversos substratos estudados. Tratando-se de sistemas 1:1, a equação de Benesi-Hildebrand foi utilizada para calcular a K_a desses complexos. Já a razão estequiométrica do complexo entre AAGac-AAPY não foi possível ser determinada por UV-Vis e fluorimetria tanto pelo método da razão molar quanto pelo método de Job.

A constante de associação entre AAGac-MCA, é cerca de dez vezes maior do que para o complexo com AA. Esse fato é bastante interessante, uma possível explicação é devido a formação de uma interação do tipo dipolo-dipolo (Figura 20) entre AAGac com MCA, já que essas moléculas possuem híbridos de ressonância

com dois pólos, enquanto que para o sistema AAGac-AA a interação deve ser do tipo interação de hidrogênio, já que o mesmo não possui um híbrido de ressonância com formação de dois pólos, desfavorecendo assim a magnitude da constante de associação.

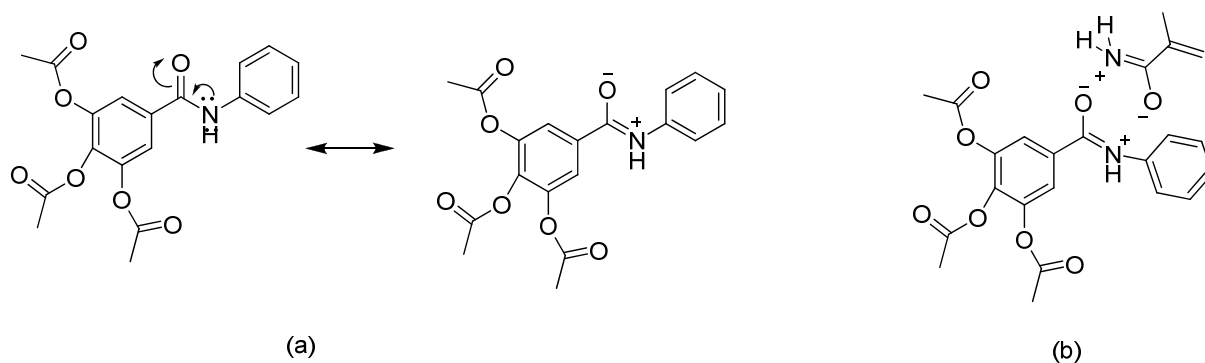


Figura 20. (a) Estruturas de ressonância da AAGac; (b) Interação da AAGac com MCA.

Já a para o AAGac-AAPY não foi possível obter a K_a , pois a interação entre eles se mostrou muito intensa a ponto de suprimir a banda de emissão do AAGac. Uma solução para esse problema seria realizar o experimento por RMN- ^1H .

6. Conclusões

Uma etapa importante na construção de polímeros molecularmente impressos (MIP's) envolve os estudos de pré-polimerização, que podem ser feitos através da determinação das estequiometrias e constantes de associação (K_a) entre um substrato e diferentes monômeros funcionais (ligantes).

Neste trabalho, buscou-se a otimização de substratos e monômeros funcionais candidatos ao uso em MIP's para liberação controlada de fármacos.

Os substratos estudados foram o ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (AG), ácido 3,4,5-triacetoxibenzóico (AGac), 3,4,5-trihidroxibenzoato de octila (EAG) e o 3,4,5-triacetoxi-*N*-fenilbenzamida (AAGac) e os monômeros funcionais ácido acrílico (AA), 4-vinilpiridina (VP), metacrílamida (MCA) e 2,6-diacriloilaminopiridina (AAPY). As estequiometrias dos complexos S-M puderam ser determinadas por diferentes técnicas, espectroscopia no UV-Vis e Fluorimetria, os valores de razão estequiométrica apresentaram discrepância em alguns resultados, não devido ao método utilizado, mas sim a técnica.

A espectrofotometria no UV-Vis não mostrou-se uma técnica eficaz na determinação da estequiometria e da constante de associação, principalmente pela sua pouca sensibilidade, enquanto que por fluorimetria pode-se obter os valores de K_a , mostrando ser uma técnica mais sensível para determinação da magnitude das interações entre os complexos moleculares S-M estudados. Os valores de K_a foram altos para os complexos moleculares entre AG-AA, EAG-VP, AAGac-VPY e AAGac-MCA, devido, principalmente, a interações do tipo dipolo-dipolo, π - π -stacking e interações de hidrogênio que favoreceram para a magnitude desses valores.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram de maneira satisfatória a importância dos estudos de pré-polimerização no desenvolvimento de polímeros molecularmente impressos. Os estudos apresentados mostram que a construção dos MIP's para liberação controlada de fármacos utilizando o ácido gálico e seus derivados como substratos, deverá ser realizada selecionando-se os monômeros funcionais que apresentaram razões estequiométricas 1:1 e com as constantes de associação mais altas.

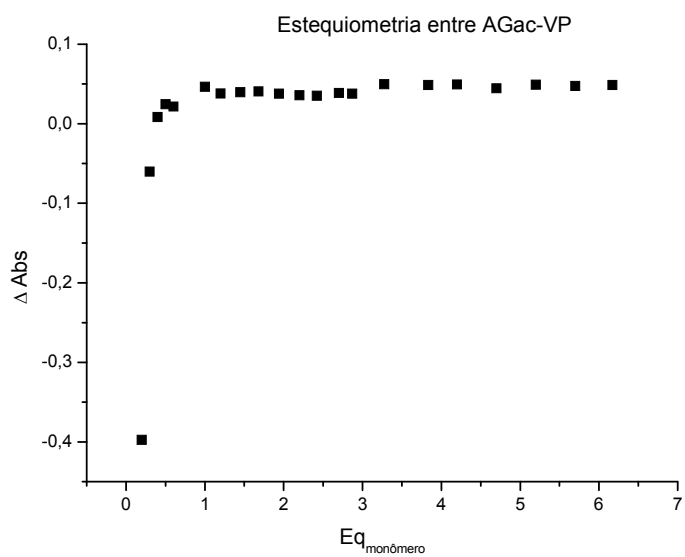
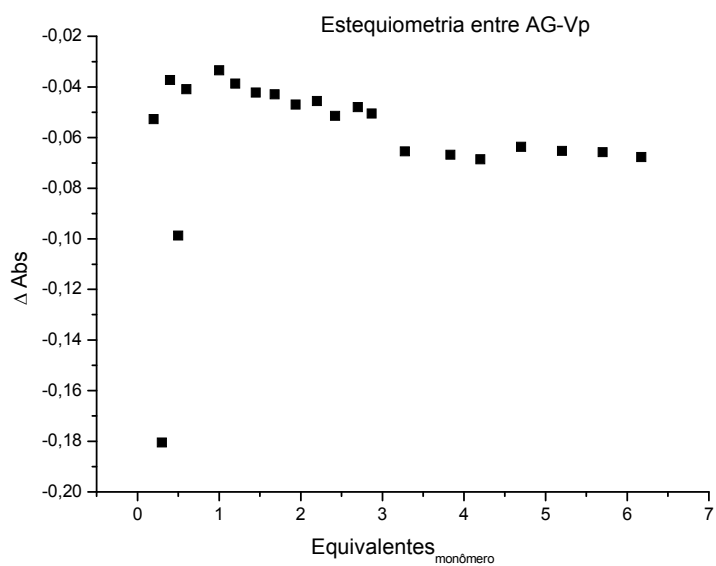
7. Referências Bibliográficas

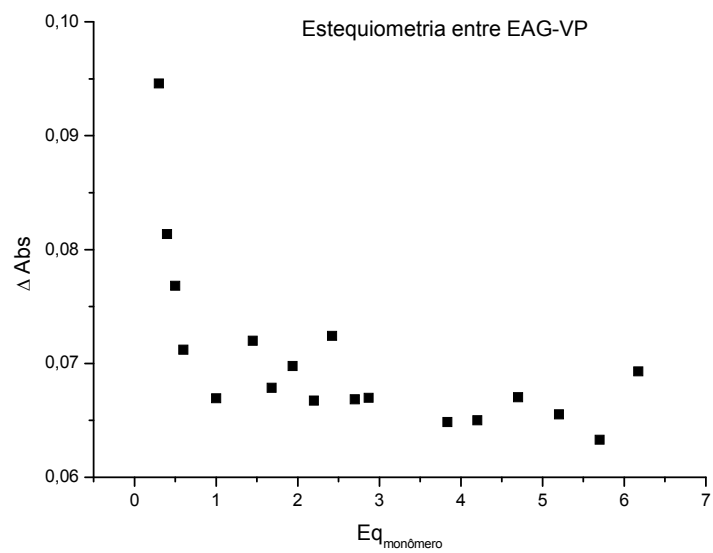
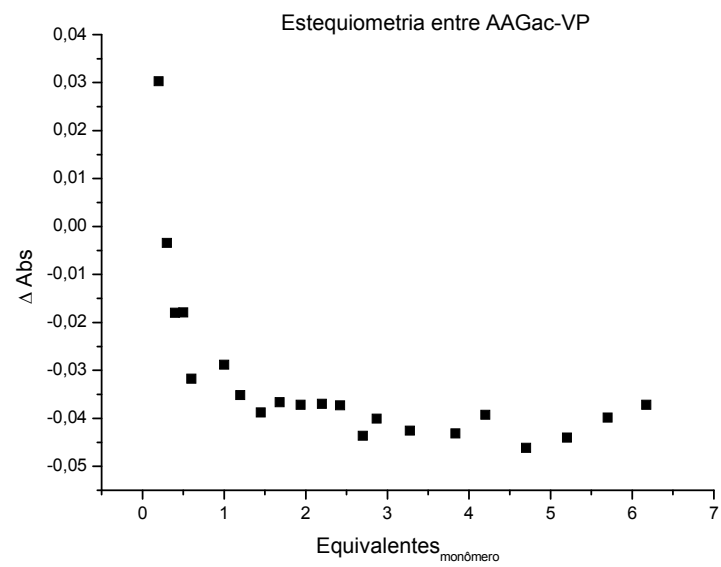
1. STUPANS, L.; OW, Y. Y. Gallic Acid and Gallic Acid Derivatives: Effects on Drug Metabolizing Enzymes. *Current Drug Metabolism*, 4, 241-248, **2003**.
2. KRATZ, J. M.; FRÖHNER, C. R.; KOLLING, D. J.; LEAL, P. C.; SANTOS, C. C.; YUNES R. A.; NUNES R. J.; TRYBALA, E.; BERGSTRÖM, T.; FRUGULHETTI I.; BARARDI, C. R.; SIMÕES, C. M. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(5), 437-442, **2008**.
3. KARIM, K., BRETON, F., ROUILLON, R., PILETSKA, E. V., GUERREIRO, A., CHIANELLA, I.; PILETSKY, S. A. How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1795 – 1808, **2005**.
4. FANG, C., YI, C., WANG, Y., CAO, Y., LIU, X. Electrochemical Sensor based on molecular imprinting by photo – sensitive polymers. *School of Chemical and Material Engineering*, 24(10), 3164 -9, **2009**.
5. LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B*, 804, 231 -245, **2004**.
6. FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 566, 60 – 68. **2006**.
7. SOUZA, M. D.; BARBOSA, C. M. Polímeros com Capacidade de Reconhecimento Molecular no Controle da Liberação de Fármacos. Parte1. Síntese e Caracterização. *Quim. Nova*, 32, 1609-1619, **2009**.
8. SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1779– 1794, **2005**.
9. DAVIES, M.P., DE BIASI, V., PERRETT, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*, 504, 7 – 14, **2004**.
10. Elvira, G.M. Catalytic inhibition of human DNA topoisomerase by phenolic compounds in *Ardisia compressa* extracts and their effect on human colon cancer cells. *Food Chem. Toxicol.*, 44, 1191-1203, **2006**.

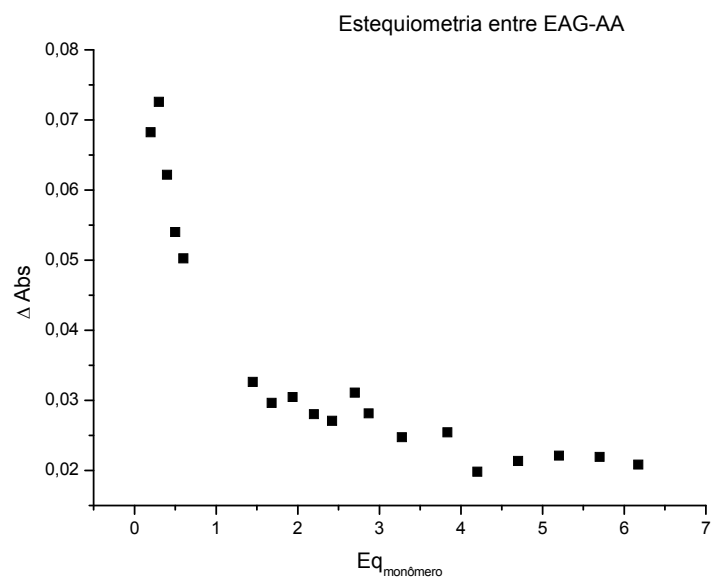
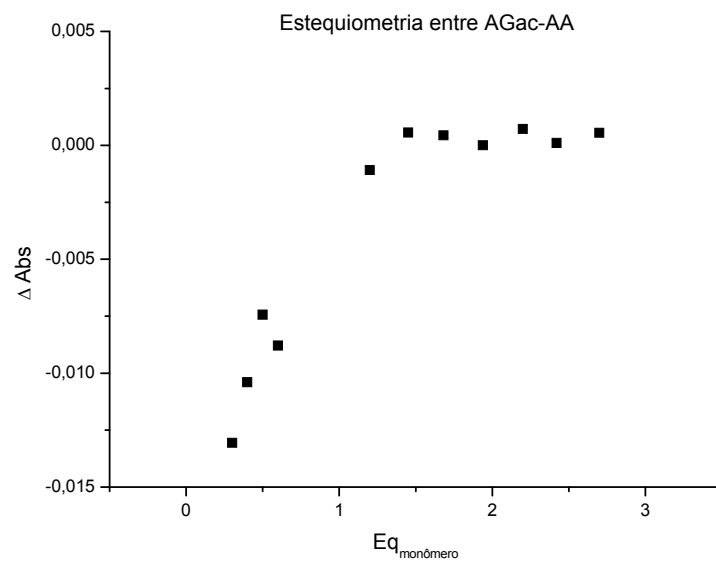
11. Chiu-Lan, H. reventive effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaves and its active compounds against R-dicarbonyl compounds-induced blood coagulation. *Food Chem.*, 103, 528-535, **2007**.
12. Misao, U., Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. *AntiViral Res.*, 73, 85-91, **2007**.
13. Jittawan, K.; Sirithon S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chem.*, 110, 881-890, **2008**.
14. Cook, J.D., Reddy, M.B. Hurrell, R.F. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61, 800-804, **1995**.
15. Aelenei, N. Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. *J. Mater. Sci: Mater Med*, 20, 1095-1102, **2009**.
16. CONNORS, K. A. Binding constants, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1987**.
17. SAWYER, T. D.; HEINEMAN, R. W.; BEEBE, M. J. Chemistry experiments for instrumental methods. John Wiley & Sons, Inc., New York, **1984**.
18. FIELDING, L. Determination of association constants from solution NMR data. *Tetrahedron*, 56, 6151-6170, **2000**.
19. KIM, D.; SHIM, E. J.; Noncovalently Linked Zinc Porphyrin-Ru(bpy)₃ Dyad Assembled via Axial Coordination. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24, 1490-1494, **2003**.
20. (a) ERDEMGIL, F. G.; SANLI, S.; SANLI, N.; OZKAN, G.; BARBOSA, J.; GUITERAS, J.; BELTRÁN, L. J.; Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72, 489–496, **2007**. (b) BENDEJACQ, D.; PONSINET, V.; JOANICOT, M.; Water-dispersed lamellar phases of symmetric poly(styrene)-block-poly(acrylic acid) diblock copolymers: Model systems for flat dense polyelectrolyte brushes. *Eur. Phys. J. E*, 3–13, **2004**.

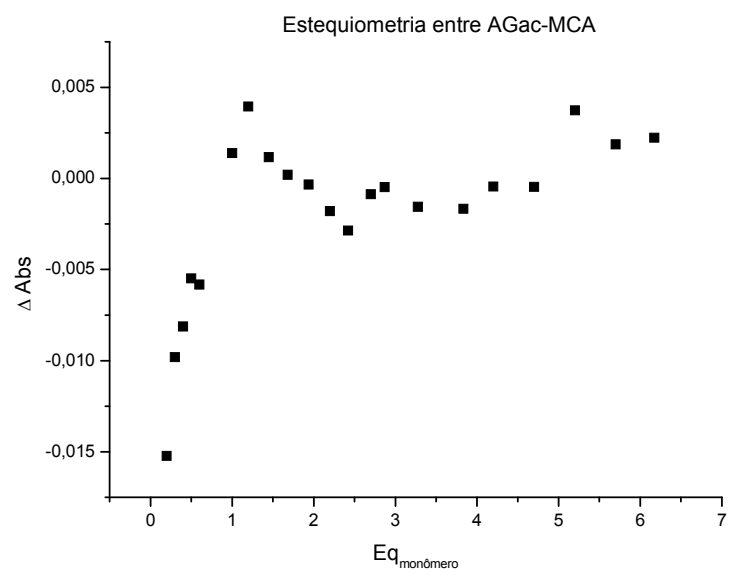
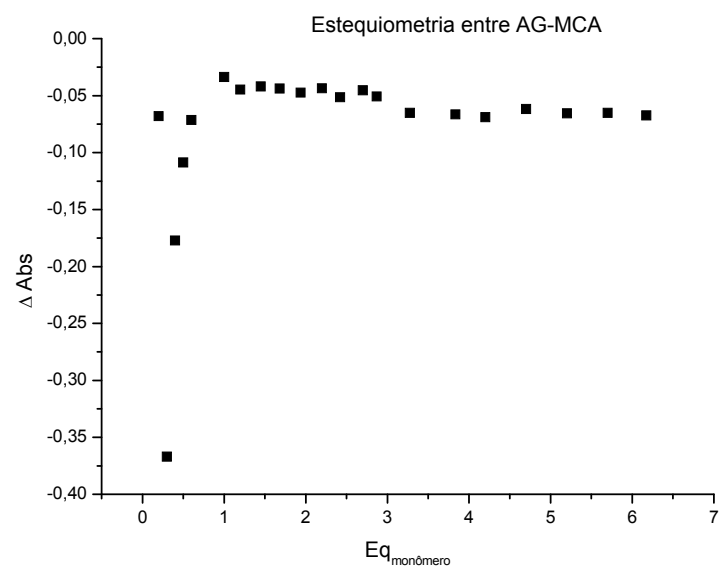
8. ANEXOS

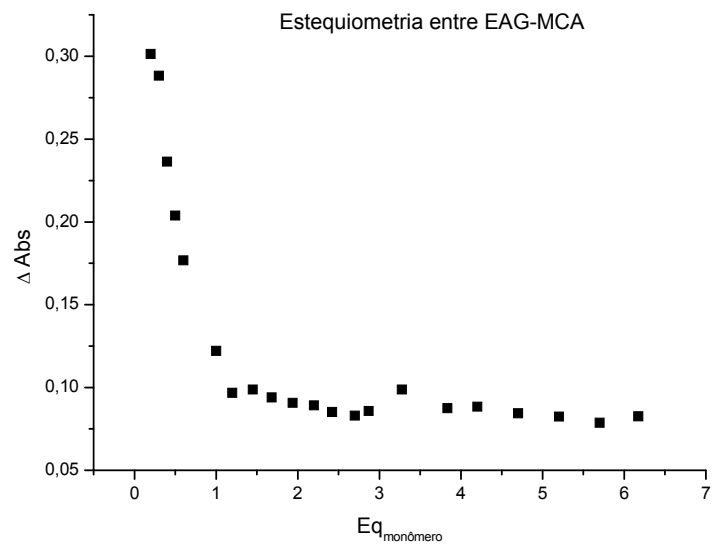
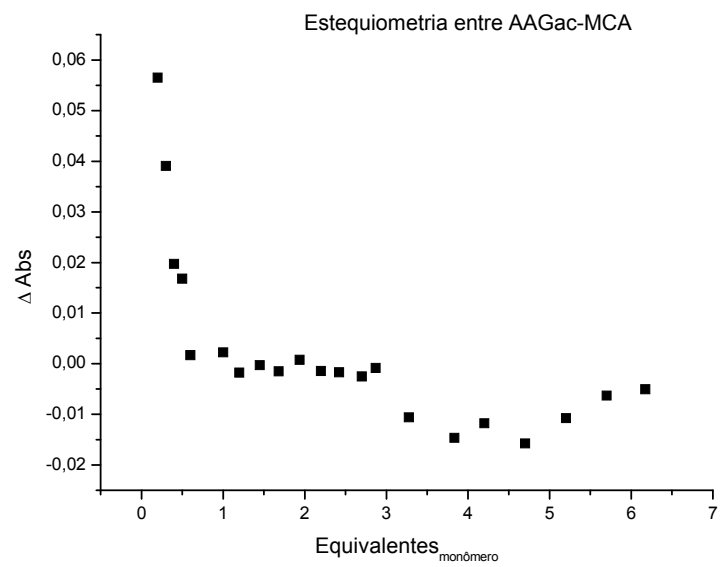
8.1 Gráficos da determinação da estequiometria pelo método da razão molar por espectrofotometria do UV-Vis



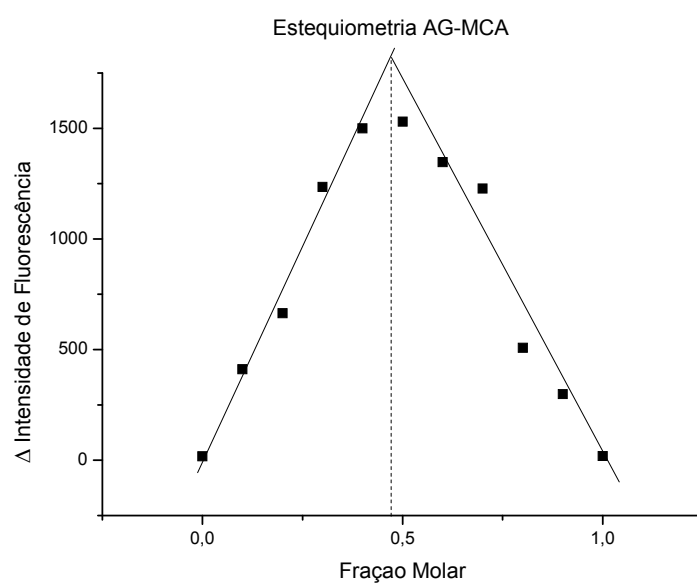
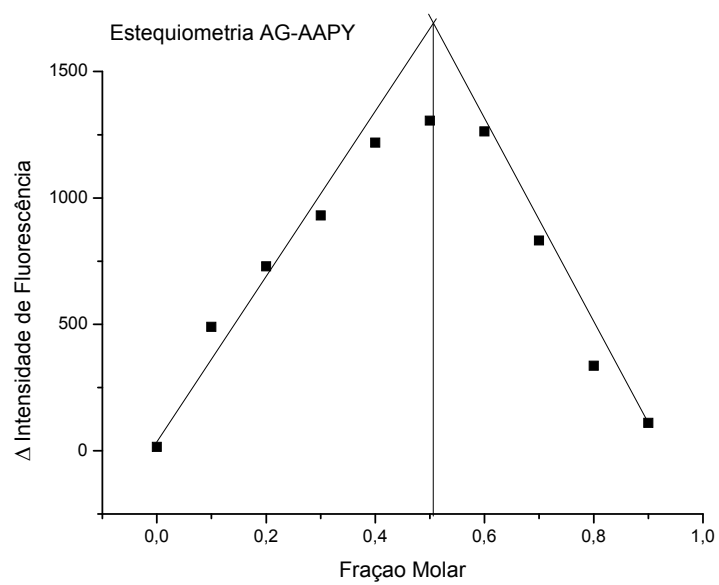


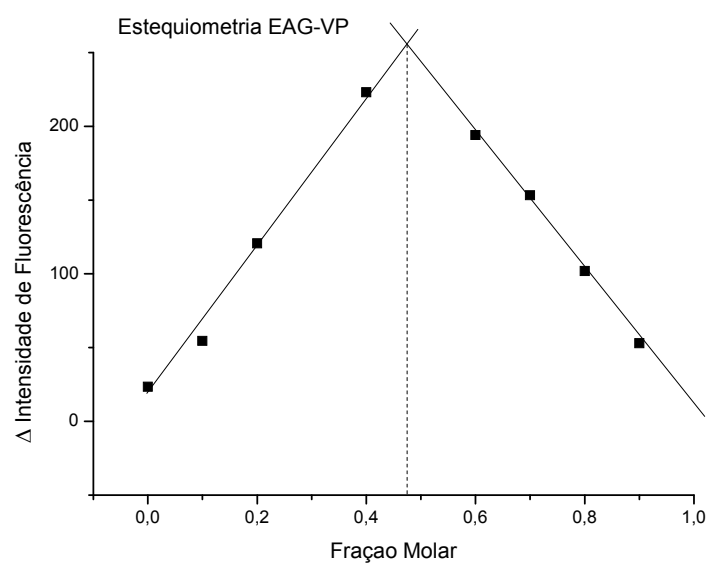
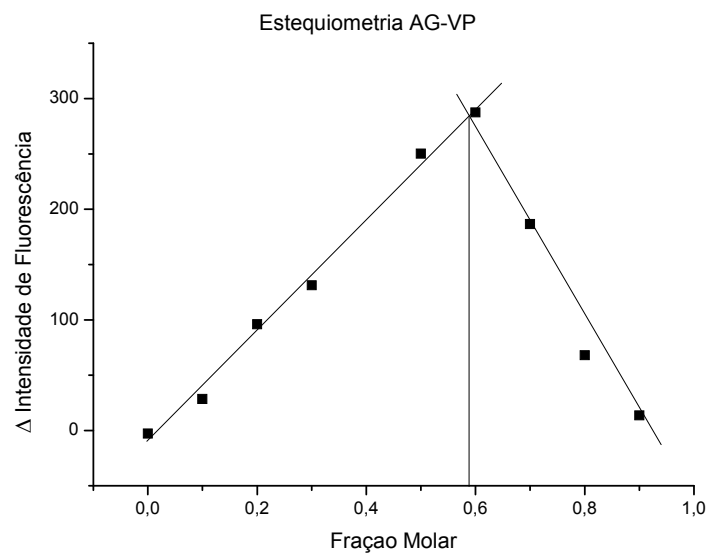


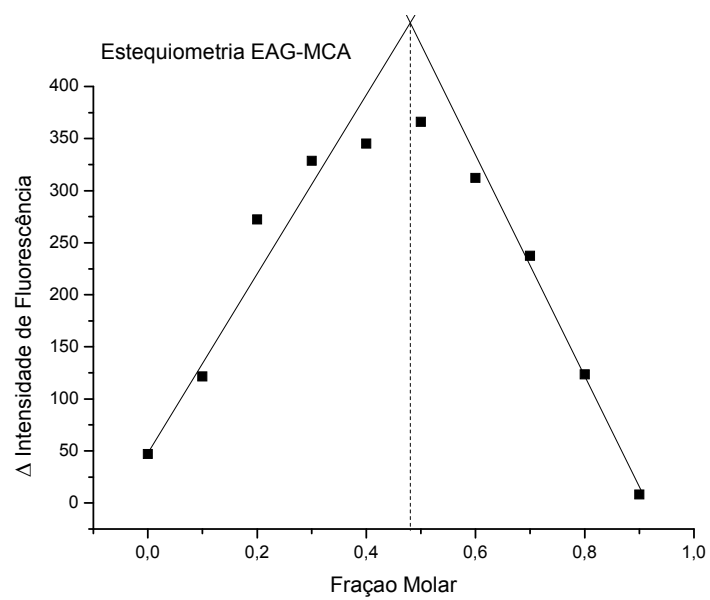
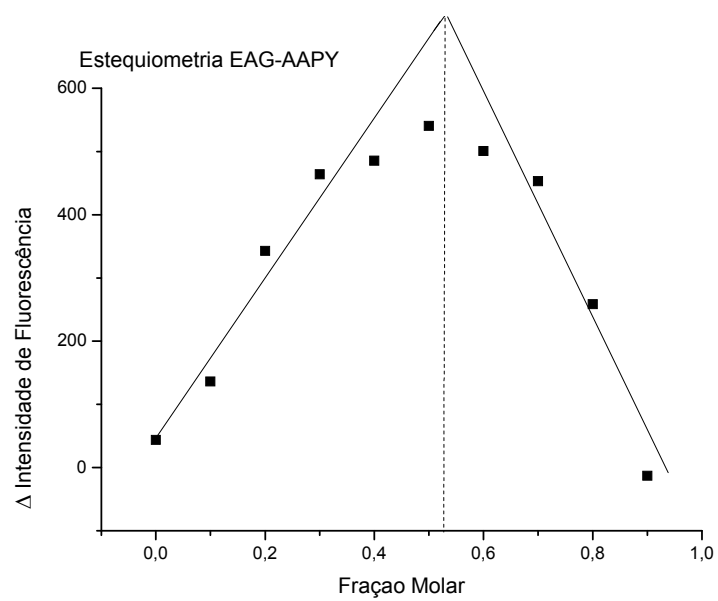


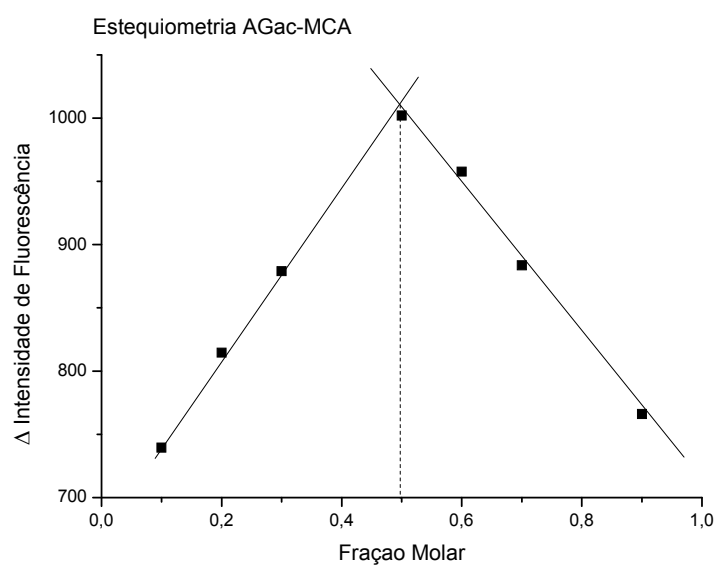
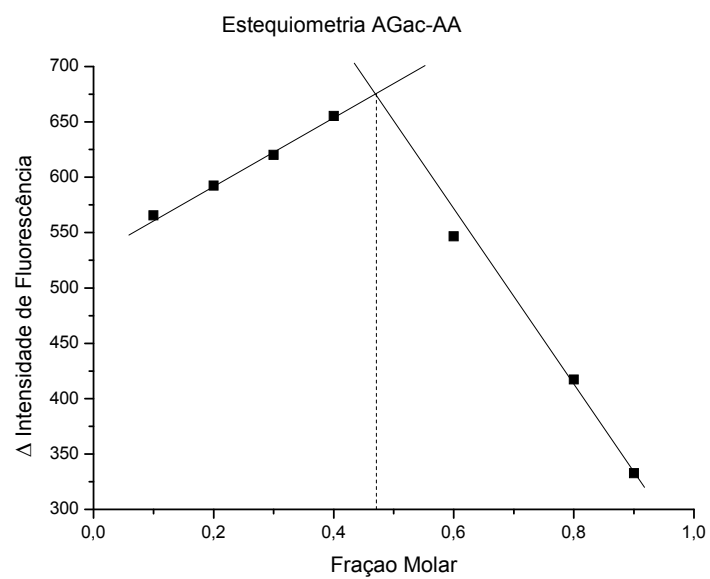


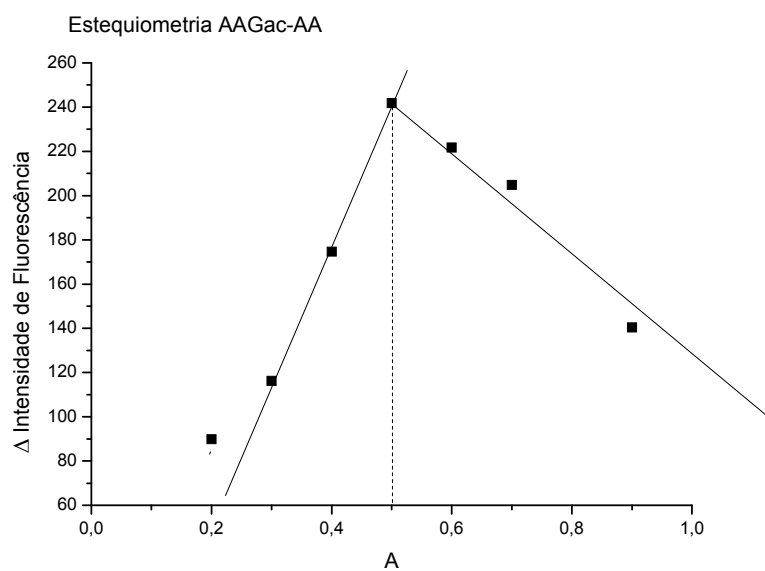
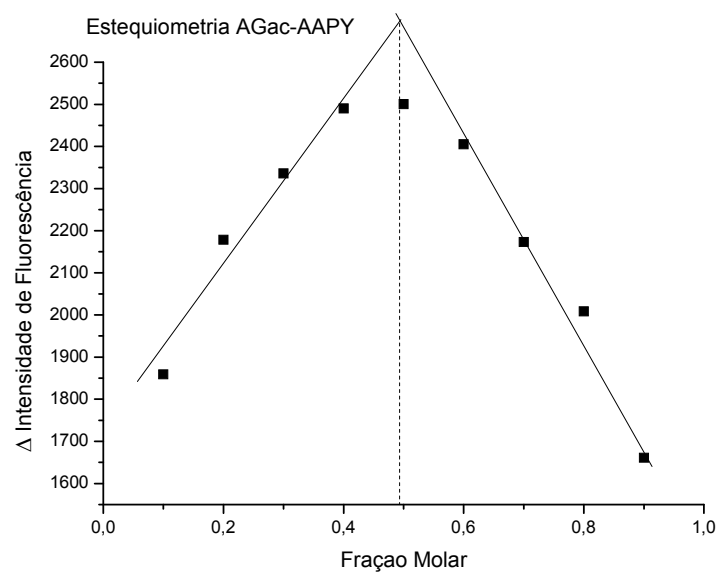
8.2 Gráficos da determinação da estequiometria pelo método de Job por Fluorimetria

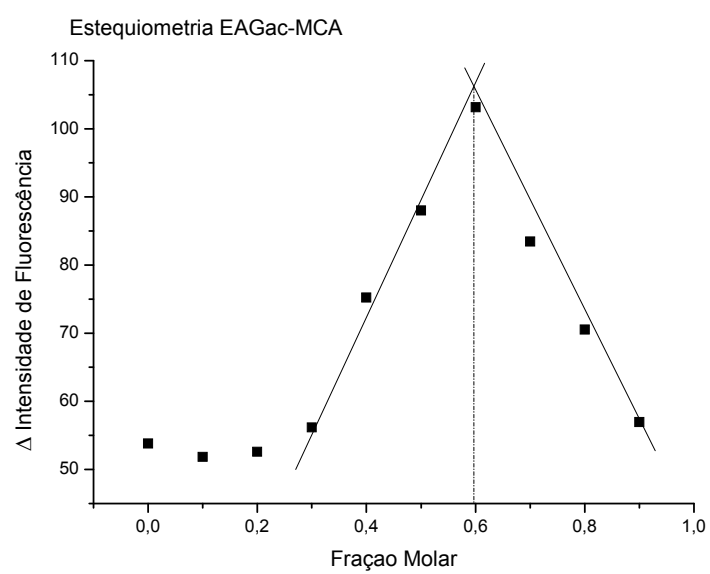
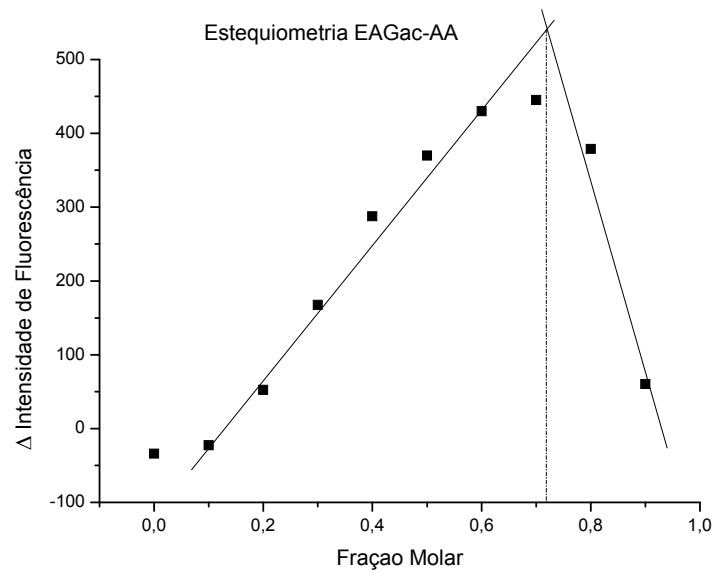


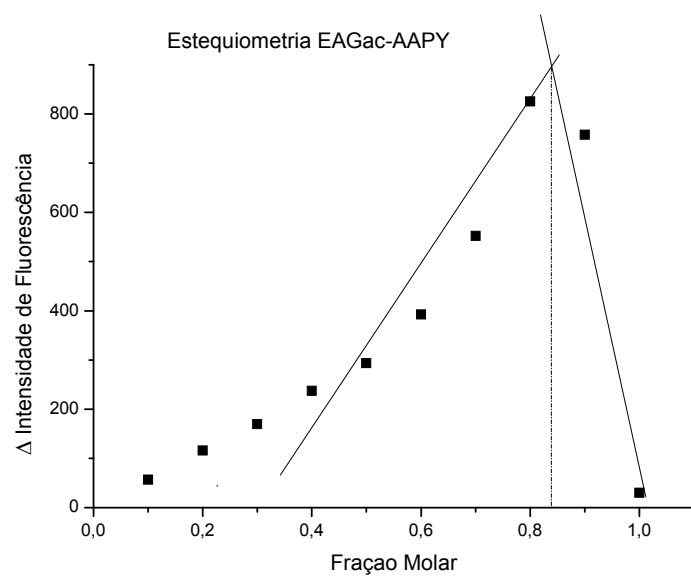
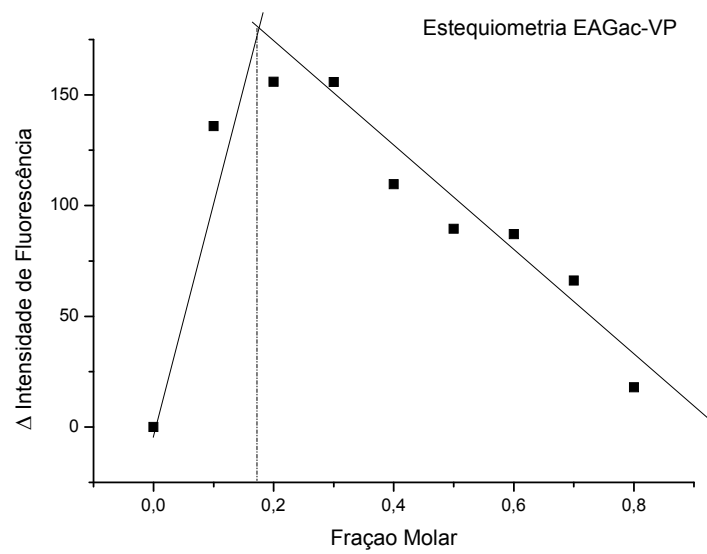




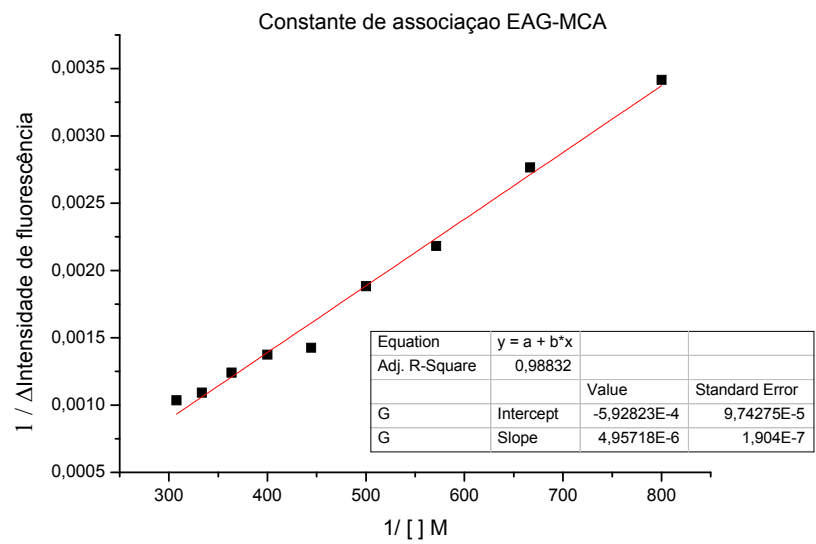
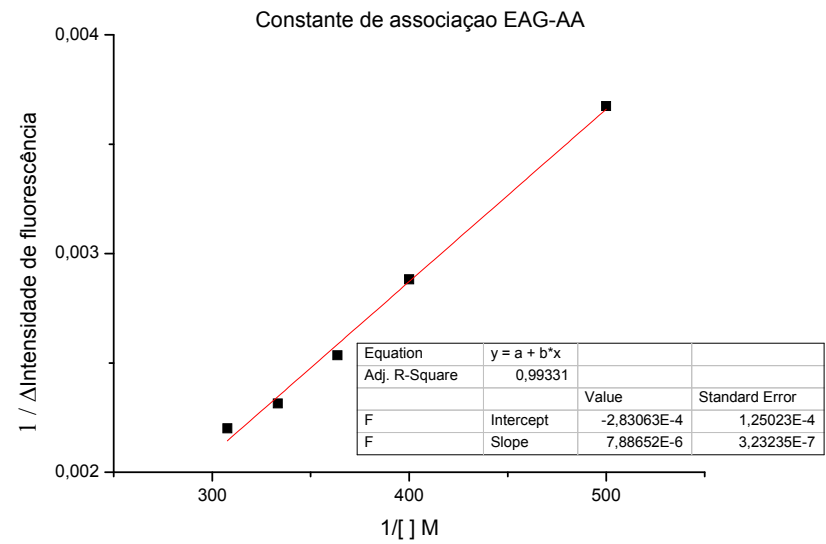


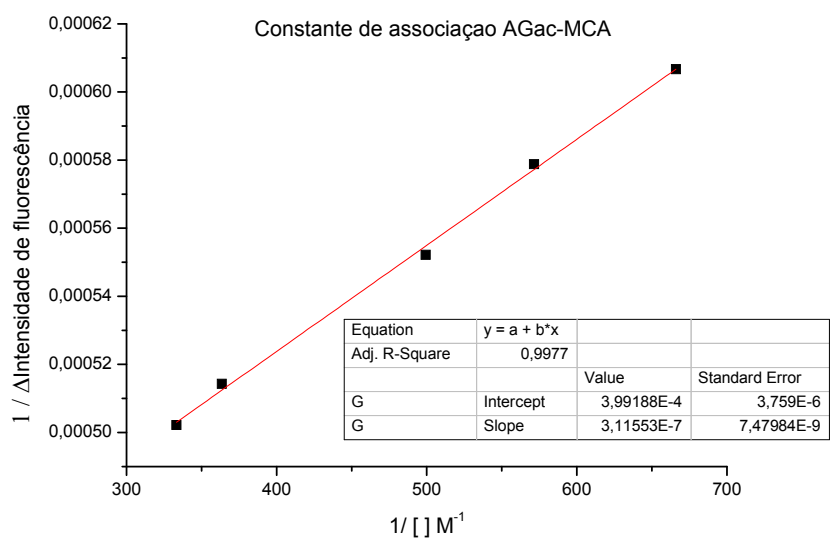
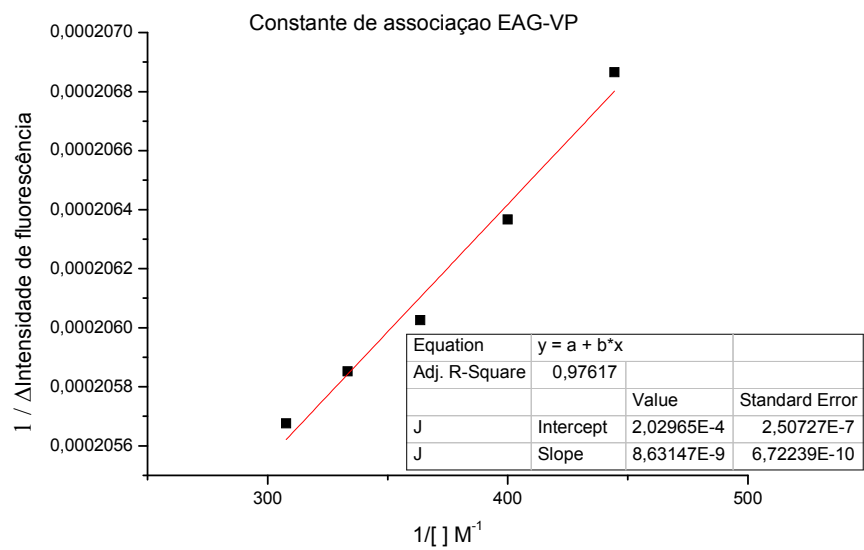


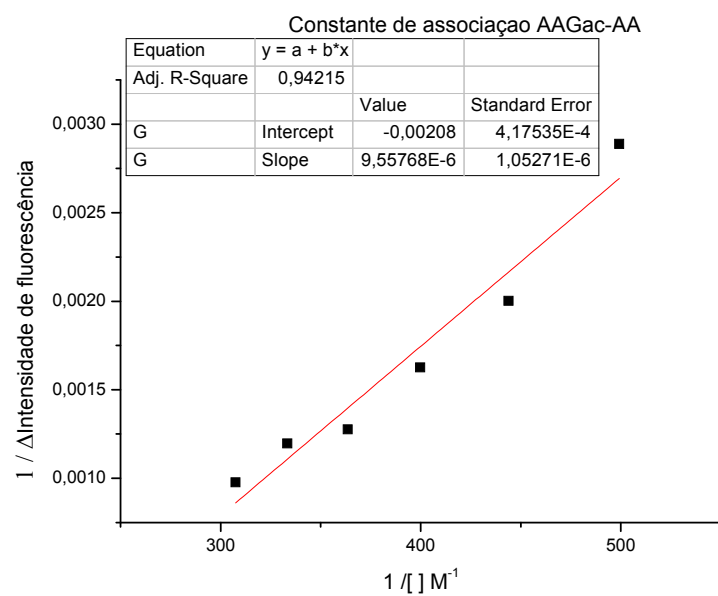
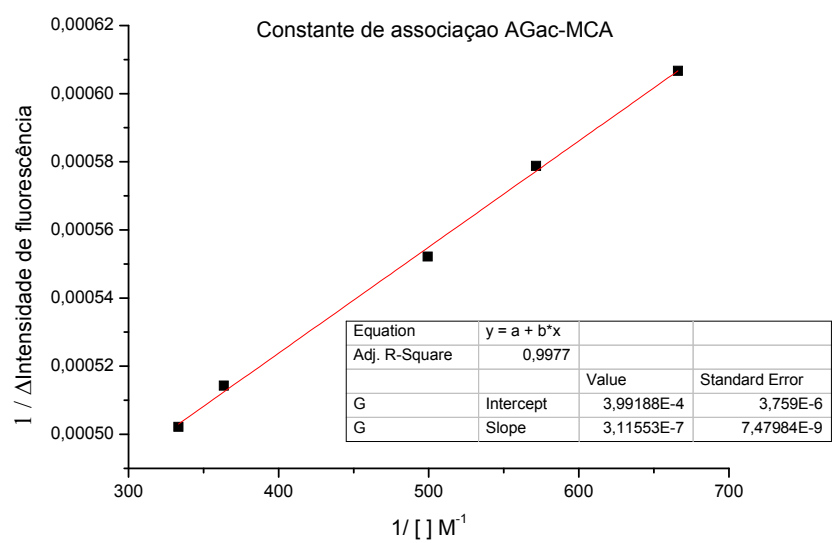


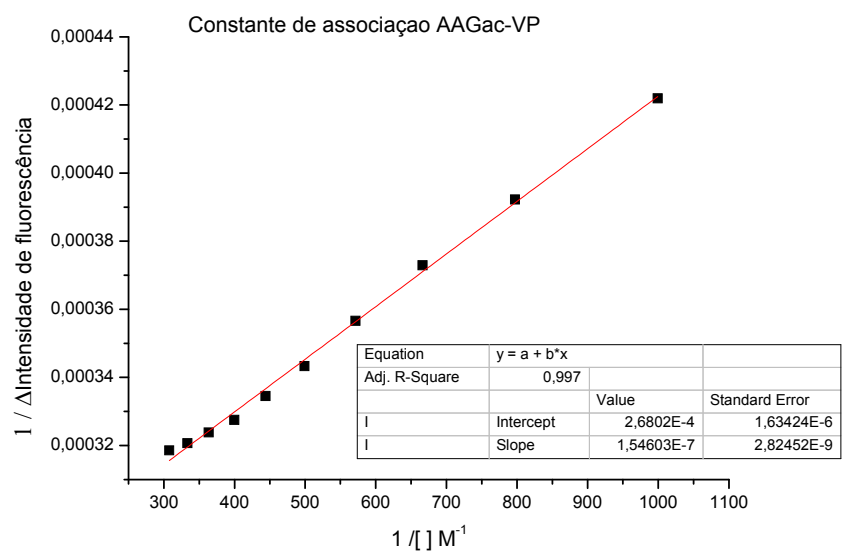
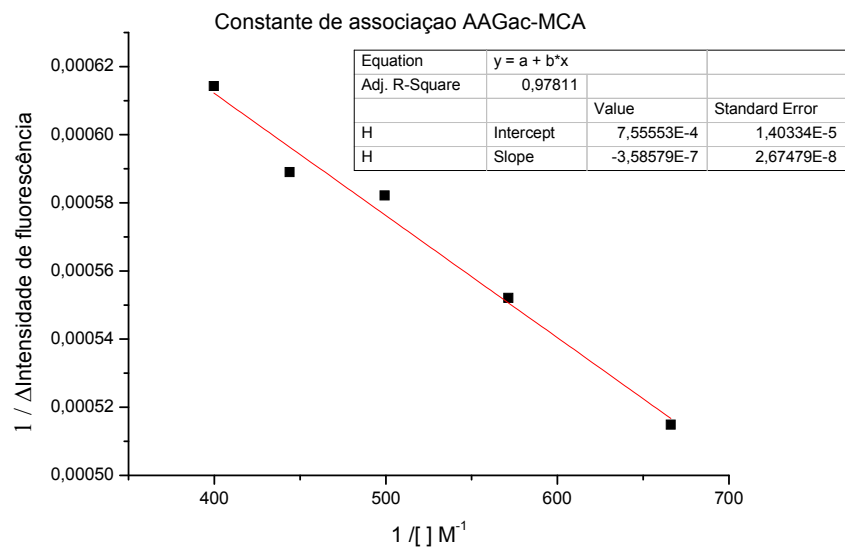


8.3 Gráficos da determinação da constante de associação pelo método de Benesi-Hildebrand por Fluorimetria

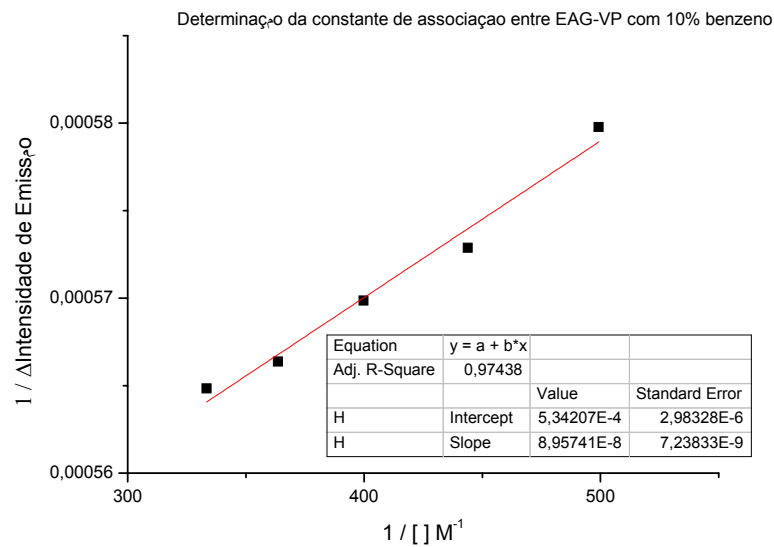
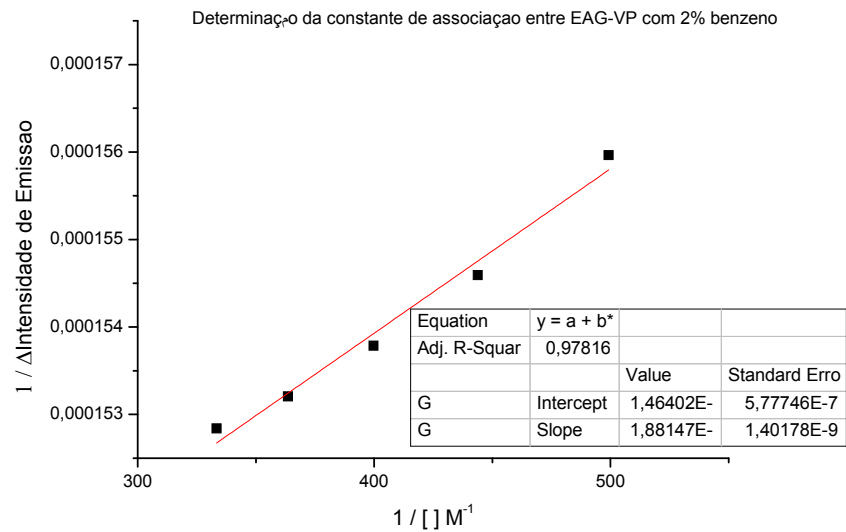


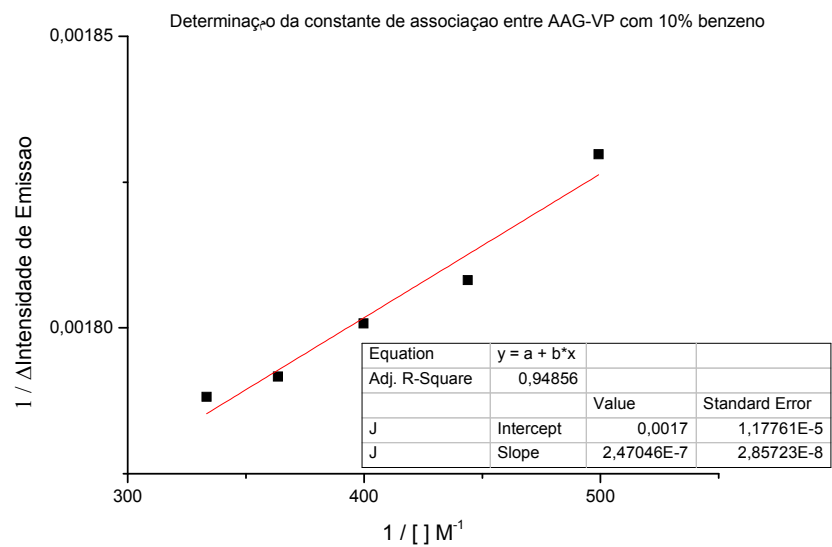
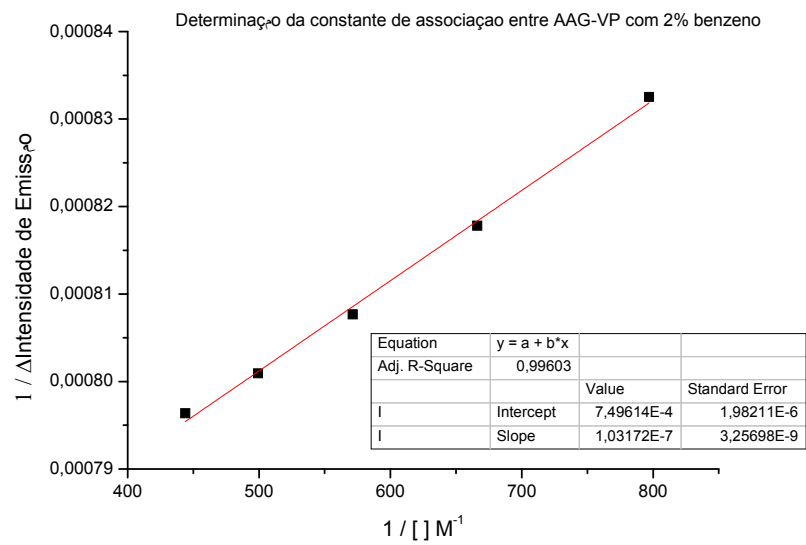






8.4 Gráficos da determinação da constante de associação, com 2 e 10% de Benzeno em ACN, pelo método de Benesi-Hildebrand, por Fluorimetria





8.5 Gráficos da determinação da constante de associação entre EAG e AAGac com BZ, pelo método de Benesi-Hildebrand, por Fluorimetria

